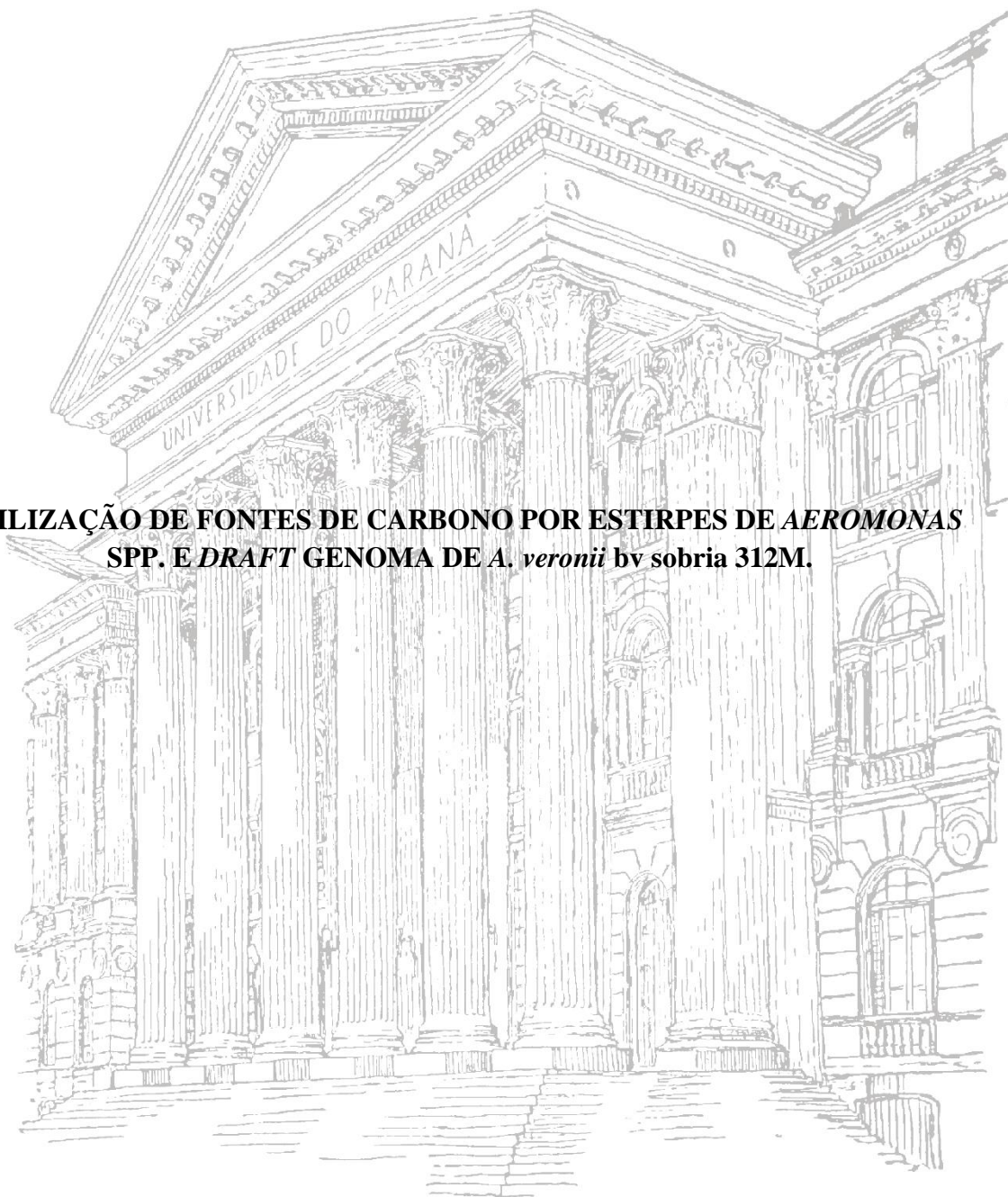


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

**SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**UTILIZAÇÃO DE FONTES DE CARBONO POR ESTIRPES DE *AEROMONAS*
SPP. E *DRAFT* GENOMA DE *A. veronii* bv sobria 312M.**



CURITIBA

2015

KAROLINE DE CAMPOS PREDIGER

**UTILIZAÇÃO DE FONTES DE CARBONO POR ESTIRPES DE *AEROMONAS*
SPP. E *DRAFT* GENOMA DE *A. veronii* bv sobria 312M.**

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em Ciências
Farmacêuticas, Área de Concentração Análises
Clínicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde,
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a Dr^a Cyntia M. T. Fadel-Picheth

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Dayane Alberton

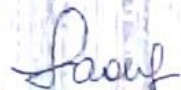
Curitiba
2015

TERMO DE APROVAÇÃO


KAROLINE DE CAMPOS PREDIGER

Título: "Utilização de fontes de carbono por estirpes de *Aeromonas* spp e draft genoma de *A. veronii* sobria 312M"

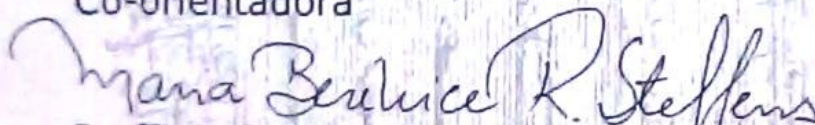
Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Análises Clínicas.



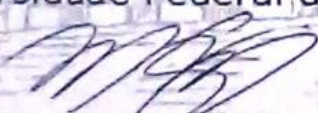
Prof.ª. Dr.ª. Cyntia Maria Telles Fadel-Picheth
Orientadora



Prof.ª. Dr.ª. Dayane Alberton
Co-orientadora



Prof.ª. Dr.ª. Maria Berenice Reynaud Steffens
Universidade Federal do Paraná



Prof. Dr. Marcelo Müller dos Santos
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 23 de fevereiro de 2015.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por seu amor infinito para comigo, por estar sempre ao meu lado, abrindo muitas portas e colocando pessoas boas no meu caminho, por todos os dias de trabalho e por todas as realizações na minha vida.

Aos meus pais Enio e Eni, irmãos Nathalia e Heinrich, vó Eva, minha família que são reflexo do cuidado de Deus na minha vida. Obrigada por toda compreensão, carinho, torcida e força. Amo vocês! Em especial à minha mãe, que nunca mediou esforços para minha formação no âmbito intelectual e pessoal. É meu grande exemplo.

Ao meu melhor amigo e namorado Marco, por estar ao meu lado sempre. Por todos os colos, abraços, atenção e amor quando mais precisei e que foram a força para chegar até o final. Prin, te amo muito!

Agradeço de forma especial à minha orientadora, Prof^a Dr^a Cyntia, pela oportunidade e confiança em mim depositada. Admiro a sua extrema competência e sabedoria em tudo que faz. Obrigada pelos ensinamentos transmitidos não só para minha vida profissional, mas também pessoal. Sou eternamente grata à você!

Agradeço à professora Dr^a Dayane Alberton, pela co-orientação, amizade, paciência e conhecimento compartilhado que permitiram a construção deste trabalho, em especial, nos experimentos de proteoma.

Às companheiras e amigas de laboratório Cibelle, Flávia, Fabrine, Isabel e Monica. Em especial, à Cibelle e Flavia, que são pessoas extremamente competentes. Obrigada pela companhia, auxílios, caronas e conversas descontraídas. Cibelle, jamais esquecerei tua ajuda e apoio, que vão muito além do convívio profissional.

Ao “teacher” e amigo Bruno. Sem você, tudo isso não teria acontecido! À ti, minha eterna gratidão!

À minha querida amiga Ana Paula, obrigada por ser minha companhia, amiga de todas as horas, mesmo a muitos quilômetros de distância. Eu jamais vou esquecer isto. Sinto muito a tua falta!

À Suelen, minha amiga do tempo de colégio para a vida toda, obrigada por ser colega, parceira, amiga e irmã! Sinto saudades da nossa convivência diária. Nossa amizade é muito valiosa pra mim.

Agradeço ao Mario Piantavini pelas análises estatísticas do Biolog. Ao Glaucio Valdameri e Prof^o Dr. Marcelo Müller pela ajuda nos experimentos de proteoma.

Aos familiares e amigos que de alguma forma contribuíram para realização desta conquista. Ficam aqui registrados em papel meus sinceros agradecimentos, mas muito mais importante, ficam guardadas em um local muito especial, todas essas pessoas que marcaram de forma tão singular esta etapa de minha vida. Muito obrigada!

RESUMO

O gênero *Aeromonas* compreende bacilos Gram-negativos, oxidase positiva, fermentadores de glucose. São capazes de causar infecções intestinais e extra-intestinais em humanos, tais como sepse e infecções de pele. O objetivo deste trabalho foi determinar o comportamento de estirpes de *Aeromonas* isoladas de amostras clínicas humanas, predominantemente fezes de pessoas com diarreia, em relação à utilização de fontes de carbono, sequenciar parcialmente o genoma da estirpe de *A. veronii* bv sobria e analisar a resposta à bile dessa bactéria. A utilização de microplacas GN2 do sistema Biolog®, que contém 95 fontes de carbono incluindo carboidratos, aminoácidos, ácidos orgânicos e nucleotídeos, mostrou que todas as estirpes oxidaram 20 dos substratos entre os quais se destacam os carboidratos em detrimento de ácidos orgânicos; para 15 substratos o resultado foi negativo para todas as estirpes analisadas e para 60 o resultado foi variável entre as bactérias. O sequenciamento do genoma da estirpe *A. veronii* bv sobria 312M, realizado utilizando a plataforma 454 GS Junior System (Roche®), resultou em um “draft” genoma de aproximadamente 4,5 Mb alocados em 526 *contigs*. A cobertura foi de aproximadamente 10 X e o conteúdo de C+G foi de 58,7%. A anotação automática do genoma foi realizada utilizando o RAST Server, que identificou 4.104 sequências codificadoras e 115 RNAs. Entre os subsistemas identificados destacam-se o de metabolismo de aminoácidos, ao qual 489 genes foram associados, e metabolismo de carboidratos, 422 genes. Em relação à virulência, destacam-se os Sistemas de Secreção Tipo III e VI, além de hemolisinas, lipase, adesinas e genes associados com síntese de cápsula; também foram identificados genes associados com resistência à antimicrobianos. Para avaliar a resposta de *A. veronii* bv sobria 312M frente ao sal biliar desoxicolato de sódio (DOC) a bactéria foi cultivada na ausência ou na presença de 24µM e 240 µM de DOC. Não houve diferença em relação ao número de colônias nas três condições, entretanto, em presença de DOC, as colônias apresentaram aumento de aproximadamente 1mm de diâmetro. A concentração de 240 µM de DOC foi utilizada para analisar o efeito do sal biliar sobre o perfil de expressão proteica de *A. veronii* bv sobria 312M utilizando SDS-PAGE e eletroforese bidimensional. Nas condições de análise não foi detectada nenhuma proteína diferencialmente expressa.

Palavras-chave: *Aeromonas*; Fontes de carbono; Sequenciamento; Genoma; Bile.

ABSTRACT

The genus *Aeromonas* contains Gram-negative bacilli, oxidase positive, glucose fermenters. *Aeromonas* are able to cause intestinal and extraintestinal infections in humans, such as sepsis and skin infections. The objective of this study was to determine the behavior of *Aeromonas* strains isolated from human clinical samples, predominantly feces of people with diarrhea, regarding the use of carbon sources; to sequence the genome of a strain of *A. veronii* bv sobria and analyze the response to bile of this bacterium. The use of the system Biolog® GN2 microplate containing 95 carbon sources including carbohydrates, amino acids, organic acids and nucleotides, showed that all strains oxidized 20 substrates, being the carbohydrates sources preferred over organic acids; for 15 substrates the result was negative for all strains analyzed and for 60 the result was variable between bacteria. The sequencing of the genome of strain *A. veronii* bv sobria 312M, performed using the 454 GS Junior System platform (Roche™), resulted in a "draft" genome of approximately 4.5 Mb allocated in 526 contigs. The coverage was approximately 10 X and the C + G content was 58.7%. The automated genome annotation was performed using RAST Server, which identified 4.104 coding sequences and 115 RNAs. Among the identified subsystems, the amino acid metabolism containing 489 genes, and carbohydrate metabolism 422 genes, exceed the other in number of genes. The Type III and Type VI Secretion Systems, as well as hemolysin, lipase, adhesin and genes associated with capsule synthesis are associated with virulence; genes associated with antimicrobial resistance were also identified. To evaluate the response of *A. veronii* bv sobria 312M to the bile salt sodium deoxycholate (DOC) the bacteria were cultured in the absence or presence of 24µM and 240 mM of DOC. There was not difference in the number of colonies among the three conditions tested, however, in the presence of DOC, the colonies diameter increased by approximately 1mm in relation to control. The concentration of DOC of 240 uM was used to examine the effect of bile salt on the protein expression profile of *A. veronii* bv sobria veronii 312 M using SDS-PAGE and two dimensional electrophoresis. In the analysis conditions no protein differentially expressed was detected.

Keywords: *Aeromonas*; Carbon sources; sequencing; genome; Bile.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Fontes de carbono nas microplacas Biolog GN2.....	19
FIGURA 2. Similaridade do perfil metabólico de estirpes de <i>A. caviae</i> em relação a utilização de 95 fontes de carbono	32
Figure 3. Similaridade do perfil metabólico de estirpes de <i>A. hydrophila</i> em relação a utilização de 95 fontes de carbono.	33
FIGURA 4. Similaridade do perfil metabólico de estirpes de <i>A. veronii</i> bv sobria em relação a utilização de 95 fontes de carbono.	34
Figure 5. Similaridade do perfil metabólico de estirpes de <i>A. trota</i> em relação a utilização de 95 fontes de carbono.	34
FIGURA 6. Similaridade do perfil metabólico de 111 estirpes de <i>Aeromonas</i> em relação a utilização de 95 fontes de carbono.....	35
FIGURA 7. Distribuição das espécies de <i>Aeromonas</i> considerando os substratos selecionados na análise de PCA.	37
FIGURA 8. Cápsula em <i>A. veronii</i> bv sobria.....	44
FIGURA 9. Crescimento de <i>A.veronii</i> bv sobria na ausência e presença de DOC.	46
FIGURA 10. SDS-PAGE de extratos proteicos <i>A. veronii</i> bv sobria	48
FIGURA 11. Gel bidimensional de extrato proteico de <i>A. veronii</i> bv sobria.....	50
Figura 12. Gel bidimensional de extrato proteico de <i>A. veronii</i> bv sobria.....	50

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Espécies do gênero <i>Aeromonas</i> e significância clínica	5
TABELA 2. Constituintes da bile.....	13
TABELA 3. Estirpes de <i>Aeromonas</i> analisadas	18
TABELA 4. Substratos utilizados de forma variável entre as estirpes*	28
TABELA 5. Genes anotados pelo RAST em subsistemas	40
TABELA 6. Crescimento de <i>A. veronii</i> bv sobria na ausência e presença de DOC	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D-PAGE	– eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida
BSA	– Albumina de soro bovino
BHI	– <i>Brain Heart Infusion</i> - Caldo Infusão de Cérebro e Coração
bv	– biovar
CHAPS	– 3-[(3-colamidopropil)-dimetil amônio]-propano-sulfonato
DOC	– Desoxicolato de sódio
DO ₆₀₀	– Absorbância em 600 nanômetros
DTT	– Ditioneitol
IEF	– Focalização isoeletrica
IPG	– Gradiente de pH imobilizado
MALDI	– Dessorção e ionização a <i>laser</i> assistida por matriz
MS	– Espectrometria de massa
NGS	– Sequenciamento de Nova Geração
PAGE	– Eletroforese em gel de poliacrilamida
pI	– Ponto isoeletrico
SDS	– Dodecil-sulfato de sódio
SDS-PAGE	– Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil-sulfato de sódio
Vh	– Voltagem/hora

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 HISTÓRICO.....	3
2.2 DESCRIÇÃO DO GÊNERO	4
2.2.1 Características morfológicas e bioquímicas	4
2.2.2 Distribuição	4
2.2.3 Importância Clínica	4
2.2.4 Identificação	9
2.2.5 Identificação Molecular.....	11
2.2.6 Suscetibilidade aos antimicrobianos	11
2.3 RESISTÊNCIA À BILE.....	12
2.4 SEQUENCIAMENTO GENÔMICO.....	14
3 OBJETIVOS.....	17
3.1 OBJETIVO GERAL.....	17
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
4.1 AMOSTRA	18
4.1.1 Utilização de fontes de carbono	18
4.1.2 Sequenciamento do genoma e interação com o sal biliar desoxicolato de sódio	18
4.2. UTILIZAÇÃO DE FONTES DE CARBONO	19
4.2.1 Condições de cultivo	19
4.2.2 Biolog®.....	19
4.2.3 Análise estatística.....	20
4.3 SEQUENCIAMENTO DO DNA GENÔMICO	20
4.3.1 Condições de cultivo	20
4.3.2 Isolamento e quantificação do DNA genômico	20
4.3.3 Sequenciamento do DNA genômico da estirpe <i>A. veronii</i> bv sobria 312M ..	21
4.4 INTERAÇÃO COM O SAL BILIAR DESOXICOLATO DE SÓDIO (doc) ..	23
4.4.1 Crescimento na ausência e presença de DOC	23
4.4.2 Análise proteômica.....	23
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
5.1 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE UTILIZAR FONTES DE CARBONO	27
5.2 SEQUENCIAMENTO GENÔMICO.....	39
5.3 INTERAÇÃO COM O SAL BILIAR DESOXICOLATO DE SÓDIO.....	45
5.3.1. Crescimento na presença e ausência de DOC	45
5.3.2 Análise Proteômica	47
5.3.3 Análise por SDS-PAGE	47
5.3.4 Eletroforese bidimensional.....	49
6 CONCLUSÕES	52
REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

Pertencentes à família *Aeromonadaceae*, *Aeromonas* spp. são bactérias amplamente distribuídas na natureza, principalmente no ambiente aquático. O gênero compreende bacilos Gram-negativos, oxidase e catalase positivas, anaeróbios facultativos, que crescem rapidamente em meios laboratoriais básicos, tais como ágar infusão de cérebro e coração, MacConkey, ágar sangue. São capazes de utilizar glucose, frutose, maltose e trealose, com produção de ácido e gás. Possuem ainda a capacidade de produzir diversas exoenzimas tais como amilase, protease, fosfolipase e DNase, e apresentam resistência ao agente vibriostático O/129 (DWIVEDI et al., 2008; PEREIRA et al., 2008; JANDA e ABBOTT, 2010).

Aeromonas podem causar uma variedade de infecções em humanos, e estas geralmente estão associadas com a ingestão de água (KHAJANCHI et al., 2010) e/ou alimentos contaminados e também contato com água contaminada (JANDA e ABBOTT, 2010). Estes micro-organismos tem recebido notoriedade como agentes causadores de diarreia, bem como de infecções extra-intestinais, tais como celulite, infecções em ferimentos, sepse, infecções do trato urinário, entre outras (LONGA et al., 2005; GUERRA et al., 2007; VON GRAEVENITZ, 2007; PEREIRA et al., 2008; JANDA e ABBOTT, 2010). As gastroenterites são as infecções mais frequentemente associadas com *Aeromonas*, e a apresentação clínica varia de diarreias agudas a crônicas, aquosas a sanguinolentas, atingindo principalmente crianças e idosos, sendo a severidade da doença diretamente relacionada aos fatores de virulência envolvidos e ao estado imunológico do paciente (LONGA et al., 2005; DWIVEDI et al., 2008, GHENGHESH et al., 2008). Diversas características associadas com virulência já foram descritas em *Aeromonas* como a produção de uma variedade de hemolisinas, toxinas citotônicas e citotóxicas, produção de cápsula, entre outros (GRIM et al., 2013, 2014).

Ainda existem poucos dados na literatura sobre a frequência de *Aeromonas* como agente de infecções em humanos no país, no entanto foi mostrado que essa bactéria é uma causa importante de diarreia no Paraná (SUREK et al., 2010; ASSIS et al., 2014). As estirpes de *Aeromonas* isoladas no Estado vêm sendo caracterizadas quanto à espécie, resistência aos antimicrobianos e características associadas com virulência (ASSIS et al., 2014; SUREK, 2014).

Considerando a importância de *Aeromonas* como agente de diarreia no Estado, e visando contribuir para ampliar o conhecimento sobre essas bactérias os objetivos deste trabalho são determinar o comportamento de estirpes de *Aeromonas* isoladas no Paraná a partir de amostras clínicas humanas em relação à utilização de fontes de carbono, contribuindo para uma melhor caracterização destes micro-organismos; sequenciar o genoma de estirpe de *A. veronii* bv sobria 312M e analisar a resposta à bile dessa bactéria. Dessa forma, será possível obter informações sobre uma espécie ainda pouco estudada e estudar sua resposta à bile, uma característica importante para a colonização e infecção intestinal e sobre a qual pouco se conhece em *Aeromonas*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 HISTÓRICO

A primeira descrição do micro-organismo classificada hoje como *Aeromonas* foi realizada por Sanarelli em 1891, quando estudou a imunidade de rãs frente ao bacilo antrax, e muitos de seus animais desenvolveram septicemia que não foi causada pelo referido bacilo. Sanarelli isolou a bactéria causal e nomeou-a *Bacillus hydrophilus fuscus*, primeiro nome atribuído às bactérias hoje conhecidas como *Aeromonas*. Outros micro-organismos semelhantes à *Aeromonas* também foram descritos durante aquele período por pesquisadores que estudavam septicemia em rãs. Outras linhagens foram rapidamente isoladas da água, do leite e de peixes. Nesta época, os métodos de identificação das espécies eram muito primitivos, tornando muito difícil determinar se os diferentes autores que relataram seus achados, realmente estudaram o mesmo micro-organismo (FARMER III, ARDUINO e HICKMAN-BRENNER, 2006).

Em 1936, o gênero *Aeromonas* foi proposto Kluyver e Van Niel (FARMER III, ARDUINO e HICKMAN-BRENNER, 2006) e conforme Isonhood e Drake (2002), a palavra “*Aeromonas*” deriva do termo grego *aer*, que significa ar ou gás, e *monas*, que significa unidade (unidade produtora de gás). Até 1979, muitas das espécies descritas foram estudadas e comparadas usando técnicas que avaliam as semelhanças e as diferenças fenotípicas. Desde 1979, técnicas moleculares que medem a distância evolutiva têm sido usadas para comparar as espécies e determinar sua relação com outras bactérias. Estas técnicas tem sido utilizadas para desenvolver uma classificação mais lógica para o gênero *Aeromonas* (FARMER III, ARDUINO e HICKMAN-BRENNER, 2006).

Inicialmente, com base nas características fenotípicas, o gênero *Aeromonas* foi incluído na família *Vibrionaceae*, que também incluía os gêneros *Vibrio*, *Photobacterium* e *Plesiomonas*. No entanto, investigações filogenéticas indicaram que o gênero *Aeromonas* não está intimamente relacionado com vibrios, mas sim forma uma unidade monofilética no subgrupo γ -3 da classe *Proteobacteria* (ABBOTT, CHEUNG e JANDA, 2003). Baseados nestas diferenças Colwell, MacDonell e De Ley (1986) propuseram a criação da família *Aeromonadaceae*.

Também ficou evidente na literatura que dois grupos diferentes de *Aeromonas* estavam sendo estudados. Um grupo, mesófilo, com crescimento ótimo a 37° C,

compreendendo estirpes móveis e não produtoras de pigmento marrom difusível. Atualmente essas estirpes compõem o grupo representado por *A. hydrophila* (FARMER III, ARDUINO e HICKMAN-BRENNER, 2006; JANDA e ABBOTT, 2010). O outro grupo, denominado psicrófilo, compreende micro-organismos imóveis e incapazes de crescer a 37°C, representado pela espécie *A. salmonicida*, um patógeno de peixes que não parece ser importante em microbiologia médica humana (KONEMAN et al., 2001; JANDA e ABBOTT, 2010; IGBINOSA et al., 2013).

2.2 DESCRIÇÃO DO GÊNERO

2.2.1 Características morfológicas e bioquímicas

O gênero *Aeromonas* compreende bacilos gram-negativos, com comprimento de 1 a 3,5 µm, apresentando formas que variam de cocóide a bacilar, retos, com extremidades arredondadas, não esporulam, podem ser móveis através de um flagelo polar, ou imóveis. São anaeróbios facultativos, oxidase positiva e fermentadores de glucose. A temperatura mínima de crescimento varia entre 0 e 5°C, a máxima entre 38 e 41°C. Os valores de pH para crescimento oscilam entre 5,5 a 9,0 (CHOPRA e HOUSTON, 1999; DEMARTA et al., 2008; DWIVEDI et al., 2008; GHENGHESH et al., 2008; PEREIRA et al., 2008; GONZÁLEZ et al., 2009).

2.2.2 Distribuição

Aeromonas são bactérias ambientais, amplamente distribuídas na natureza, principalmente no ambiente aquático e podem causar doenças em animais aquáticos; também podem ser encontradas no solo e nos produtos agrícolas (KONEMAN et al., 2001; HOFER et al., 2006; DWIVEDI et al., 2008; PEREIRA et al., 2008; FIGUEIRA et al., 2011). Essas bactérias também são encontradas em sarjetas e canos de esgoto e podem ser isoladas de amostras de água corrente e de depósitos de água destilada, que são potenciais fontes de micro-organismos envolvidos em infecções hospitalares (KONEMAN et al., 2001).

2.2.3 Importância Clínica

A capacidade da *Aeromonas* causar doenças em diferentes espécies animais já está muito bem estabelecida e documentada na literatura científica. O primeiro caso de

infecção em humanos relacionado ao gênero *Aeromonas* foi descrito em 1954, em uma mulher na Jamaica que foi a óbito por septicemia fulminante. Desde 1961, quando uma estirpe de *Aeromonas* spp. foi isolada de fezes humanas, estes micro-organismos vem sendo identificados como agentes causadores de diarreia (VON GRAEVENITZ, 2007).

Existem atualmente 21 espécies no gênero *Aeromonas*, descritas na tabela 1 (adaptado de JANDA e ABBOTT, 2010). Pelo menos 11 delas foram associadas com infecções em humanos (descritos na tabela 1), mas *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. veronii* biovar sobria são consideradas as de maior relevância clínica (VILA et al., 2003; GUERRA et al., 2007; DWIVEDI et al., 2008).

TABELA 1. Espécies do gênero *Aeromonas* e significância clínica

Espécies	Clinicamente significante
<i>A. hydrophila</i>	Sim
<i>A. salmonicida</i>	Sim
<i>A. sobria</i>	Não
<i>A. media</i>	Sim
<i>A. caviae</i>	Sim
<i>A. veronii</i>	Sim
<i>A. eucrenophila</i>	Não
<i>A. schubertii</i>	Sim
<i>A. jandaei</i>	Sim
<i>A. trota</i>	Sim
<i>A. encheleia</i>	Não
<i>A. bestiarum</i>	Sim
<i>A. popoffii</i>	Sim
<i>A. simiae</i>	Não
<i>A. molluscorum</i>	Não
<i>A. bivalvum</i>	Não
<i>A. aquariorum</i>	Não
<i>A. tecta</i>	Sim
<i>A. allosaccharophila</i>	Não
<i>A. culicicola</i>	Não
<i>A. sharmiana</i>	Não

Nas últimas décadas, *Aeromonas* tem sido cada vez mais reconhecidas como agentes etiológicos relevantes em infecções gastrointestinais (PEMBERTON et al., 1997; VILA et al., 2003; LONGA et al., 2005; GUERRA et al., 2007; SUREK et al., 2010) bem como infecções extra-intestinais tais como celulite, infecções da ferida, septicemia, meningites, infecções do trato urinário, síndrome hemolítica urêmica, entre outros (GUERRA et al., 2007; VON GRAEVENITZ, 2007; PEREIRA et al., 2008; KHAJANCHI et al., 2010; CARVALHO et al., 2012).

A infecção geralmente ocorre após o contato ou consumo de água e alimentos contaminados (JANDA e ABBOTT, 2010), indicando o risco potencial para a saúde que a presença desses micro-organismos na água pode representar (FIGUEIRA et al., 2011; CARVALHO et al., 2012) .

2.2.3.1 Infecções gastrintestinais

A diarreia causada por *Aeromonas* pode apresentar manifestações clínicas variadas, desde doença diarréica aguda autolimitada de curta duração, diarreia crônica em crianças, idosos ou imunocomprometidos, e também diarreia dos viajantes. Alguns pacientes podem apresentar febre, dor abdominal e diarreia sanguinolenta. A desidratação pode acompanhar os sintomas anteriormente mencionados em alguns casos. A importância das espécies de *Aeromonas* como agente causador de diarreia tem sido bem estabelecida (VILA et al., 2003; ALBARADO, SAMPER e GUZMÁN, 2005; LONGA et al., 2005; DWIVEDI et al., 2008; GHENGHESH et al., 2008).

A participação de *Aeromonas* como causa de infecção ainda é pouco documentada no Brasil, são poucos os relatos sobre a ocorrência das espécies do gênero, estudos sobre resistência, presença de genes de virulência, e o risco que esses micro-organismos representam para a saúde pública (BALSALOBRE, 2009). As informações disponíveis estão relatadas a seguir.

Nojimoto et al. (1997) analisaram 163 amostras de fezes de crianças com idade abaixo de 5 anos, sendo 91 de fezes diarréicas e 72 de fezes não diarréicas. Dentre as fezes diarréicas foram isoladas 21,9% de *Aeromonas* spp., enquanto que das fezes não diarréicas nenhuma bactéria deste gênero foi isolada.

Em 2004, em São Bento do Una, Pernambuco, ocorreu um surto de diarreia, com 2170 casos da doença. Nas 582 coproculturas realizadas, Hofer et al. (2006) verificaram que em 145 (25%) havia apenas um enteropatógeno bacteriano, destacando em 114 (19,5%) dos casos a participação de *Aeromonas*, mais especificamente as espécies *A. caviae* (57/9,8%), *A. veronii* biovar sobria (23/3,9%), *A. veronii* biovar veronii (15/2,6%), entre outras (19/3,2%). A faixa etária mais afetada foi de crianças entre 1 a 5 anos (50-34,4%), seguida daquela entre 0 a 11 meses (17-11,7%), e então indivíduos com 11 a 19 anos e 30 a 39 anos, cada um com 16 (11%) pessoas.

Guerra et al. (2007) encontraram uma prevalência de 6,6% de espécies de *Aeromonas* em culturas de fezes de lactantes e crianças hospitalizados no Rio Grande do Sul em decorrência de diarreia. Os isolados foram classificados como *A. hydrophila* (51,8%), *A. caviae* (40,8%) e *A. veronii* biovar sobria (7,4%). Os isolados apresentaram atividade hemolítica, proteolítica e lipolítica e a capacidade de formar biofilme, a presença dos genes de virulência aerolisina (*aerA*), serina protease (*ahpA*), elastase (*ela*) e lipase (*lipA*) foram observados na maioria dos isolados de *A. hydrophila* e *A. veronii* biovar sobria, e com frequência menor em *A. caviae*.

Pereira e colaboradores (2008) avaliaram 2.323 swabs retais de neonatos com sintomas de diarreia aguda hospitalizados em unidades de terapia intensiva de três hospitais municipais no Rio de Janeiro, no período de 1998 a 2006 objetivando o isolamento de *Aeromonas*. Na investigação, 56 estirpes de *Aeromonas* foram identificadas, sendo *A. caviae* em 42,8% dos isolados, seguida de *A. media* (25%), *A. veronii* biovar sobria (10,7%), *A. hydrophila* (9%), *A. veronii* biovar. veronii (5,3%), *A. sobria*, *A. jandaei* e *A. schubertii* (1,8% cada) e um isolado caracterizado apenas como *Aeromonas* spp.

Surek et al. (2010) realizaram a análise de 680 amostras de fezes de pacientes com diarreia e 300 controles saudáveis em Curitiba, Paraná, objetivando a pesquisa de *Aeromonas* spp. e *Plesiomonas*. Todos os pacientes apresentavam diarreia aquosa, não-sanguinolenta, com alguns relatos de dores abdominais e náuseas. *Aeromonas* foram isoladas de 19 amostras, 18 provindas de pacientes com diarreia (2,6%) e 1 a partir de pessoa saudável (0,3%). Houve uma diferença estatisticamente significativa na prevalência de *Aeromonas* entre os dois grupos, sugerindo que a presença da bactéria está associada com a doença. As bactérias foram caracterizadas através de testes microbiológicos convencionais sendo 12 identificadas como *A. caviae* e uma como *A. veronii* biovar sobria, três pertencentes ao complexo *A. caviae*, duas ao complexo *A. hydrophila* e uma foi apenas identificada ao nível de gênero. *Aeromonas* foi encontrada em crianças e adultos, cujas idades variaram de 1 a 82 anos. Neste trabalho, Surek et al. (2010) encontraram uma prevalência de *Aeromonas* semelhante ao observado para outros patógenos entéricos, como *Escherichia coli* enterotoxigênica, *E. coli* enteroinvasiva, *Shigella* e *Campylobacter* e os dados preliminares indicavam que havia uma prevalência de 2,6% de *Aeromonas* nos casos de diarreia no Estado do Paraná.

Também no Paraná, Assis e colaboradores (2014) realizaram análise de 400 amostras fecais de pacientes com diarreia objetivando determinar a frequência de enteropatógenos bacterianos. Utilizando métodos microbiológicos convencionais para cultura e identificação, o índice de positividade para *Aeromonas* foi de 6,5%. *A. caviae* foi a espécie predominante.

Os dados acima indicam que *Aeromonas* é uma causa importante de diarreia no país.

Destaca-se também a característica de sazonalidade observada em alguns estudos de infecções gastrintestinais, os quais revelaram que épocas de temperaturas ambientais elevadas apresentaram maiores índices de isolamento de *Aeromonas* (LONGA et al., 2005; PEREIRA et al., 2008).

2.2.3.2 Infecções extra-intestinais

As infecções extra-intestinais causadas por *Aeromonas* incluem eventuais infecções primárias em hospedeiros normais (cistite e infecções em ferimentos), bem como infecções graves (incluindo septicemia, peritonite, endocardite, osteomielite, meningite, fasciíte necrotizante e síndrome urêmico-hemolítica,) em pacientes imunodeprimidos (TENA et al., 2007; DWIVEDI et al., 2008; GRIM et al., 2014).

Aeromonas spp. podem causar celulite ou infecções de feridas após contato de uma lesão traumática com um ambiente aquoso contaminado com a bactéria.

As principais condições predisponentes para infecções graves causadas por *Aeromonas* incluem cirrose ou outra doença hepática, doenças hematológicas malignas e doenças hepatobiliares (DWIVEDI et al., 2008; JANDA e ABBOTT, 2010).

Na Espanha, Tena e colaboradores (2007) revisaram de forma retrospectiva os históricos clínicos de pacientes admitidos no Hospital Universitário de Guadalajara dos quais *Aeromonas* spp. foram isolados de amostras de fezes. Foram identificados 38 casos de infecções extra-intestinais causadas por *Aeromonas* spp. sendo 18 infecções abdominais, 11 infecções da pele e tecidos moles, 3 do trato urinário, 3 do trato respiratório e 3 bacteremias. A espécie mais frequente foi *A. hydrophila* (16 casos). Aproximadamente 76% dos pacientes apresentavam patologias predisponentes, sendo as de natureza neoplásica as mais frequentes (34%), seguida de *diabetes mellitus* (21%).

A septicemia por *Aeromonas* é uma doença rara, geralmente observada em pacientes com múltiplos problemas médicos e imunocomprometidos, especialmente

aqueles com doenças malignas ou hepatobiliar. A sepse também pode ocorrer como resultado de contaminação das feridas em fontes de água doce ou solo ou com o uso de sanguessugas medicinais. A espécie mais comum envolvida com septicemia é *A. hydrophila* (DWIVEDI et al., 2008; JANDA e ABBOT, 2010).

A mesma sazonalidade observada em relação aos isolados intestinais de *Aeromonas* também foi observada na septicemia, onde 42% a 67% dos casos analisados ocorreram durante a temporada de verão. Os sintomas mais comuns associados com a septicemia por *Aeromonas* incluem febre, icterícia, dor abdominal e dispneia. Diarreia imediatamente anterior ou concomitante com o início de septicemia ocorre em uma porcentagem muito pequena dos casos (JANDA e ABBOTT, 2010).

Em pessoas saudáveis, que aparentemente não possuem fatores de risco reconhecidos para infecção e sem nenhum trauma ou evento reconhecido para a entrada destes organismos no sistema circulatório, a septicemia por *Aeromonas* se apresenta em um grupo pequeno, mas crescente (KAMANO et al., 2003; DWIVEDI et al., 2008; JANDA e ABBOTT, 2010), o que pode ser decorrente do reconhecimento de *Aeromonas* como patógeno humano e melhoria nos sistemas de identificação.

As infecções de pele e tecidos moles causados por *Aeromonas* podem variar de problemas específicos leves, tais como lesões pustulares à infecções graves ou potencialmente fatais, que podem variar de infecções dos tecidos subcutâneos (celulite) à processos que envolvem as camadas mais profundas da pele e do tecido subcutâneo ao e espalhar ao longo dos planos fasciais (fasciíte necrotizante) com potencial para causar graves danos ao tecido muscular (mionecrose) (CHENG et al., 2004; THAICHINDA e KOSITPANTAWONG, 2008; JANDA e ABBOTT, 2010; GRIM et al., 2014).

2.2.4 Identificação

Aeromonas spp. são bacilos gram-negativos oxidase e catalase positivos, anaeróbios facultativos, que crescem rapidamente em meios laboratoriais básicos, tais como ágar infusão de coração, MacConkey, CLED, ágar sangue, entre outros. Entre as espécies isoladas de humanos, mais de 90% produzem hemólise em ágar sangue de carneiro, com exceção de *A. trota* e *A. popoffii* (0% e 50%, respectivamente). São capazes de oxidar e fermentar glucose, frutose, maltose e trealose, com produção de ácido e gás. As espécies deste gênero (com exceção do *A. schubertii*) são consideradas indol positivo, mas em especial *A. caviae*, podem permanecer negativo após sete dias,

mesmo utilizando a extração com xileno. Possuem a capacidade de produzir uma série de exoenzimas (amilase, protease, fosfolipase e Dnase) e apresentam resistência ao agente vibriostático O/129 (JANDA e ABBOTT, 2010; PARKER e SHAW, 2011).

Aeromonas spp. podem ser diferenciadas dos gêneros *Pseudomonas*, *Shigella*, *Vibrio* através das provas de oxidase, fermentação da glucose, produção de gás a partir da glucose, reação do citrato, produção de ácido a partir do manitol, motilidade e sensibilidade ao agente vibriostático O/129. A prova da oxidase permite diferenciar *Aeromonas* spp. de bactérias da família *Enterobacteriaceae*, que são negativas para este teste; a resistência ao agente vibriostático O/129 permite diferenciá-las dos *Vibrio* spp., que normalmente são sensíveis. A distinção entre a *Aeromonas* spp. e *Shigella* spp. se dá pelas provas de oxidase e motilidade, apresentando resultados positivos para o gênero *Aeromonas*, enquanto que testes de fermentação da glucose e a produção de ácido do manitol permitem diferenciá-las das *Pseudomonas* spp., que são negativas para as duas provas (PARKER e SHAW, 2011).

Para diferenciação entre as espécies de *Aeromonas* spp. são necessárias várias provas bioquímicas, destacando-se a descarboxilação da ornitina e lisina, arginina, hidrólise da esculina, produção de gás da glucose, Voges-Proskauer, indol, uso da arabinose e produção de ácido do manitol (PALUMBO et al., 2001; ABBOTT, CHEUNG e JANDA, 2003).

Uma das maiores dificuldades na identificação de bactérias do gênero *Aeromonas* ao nível de espécie é o contínuo número de espécies novas reconhecidas, tornando a taxonomia do gênero complexa e marcada por confusão e controvérsia (SAAVEDRA et al., 2006). Além disso, apesar dos testes fenotípicos usados para a identificação serem os mesmos em estudos diferentes, as condições de crescimento, composição do meio, inoculação e incubação variam consideravelmente, afetando os resultados (ABBOTT, CHEUNG e JANDA, 2003) e a identificação inadequada do gênero dificulta os estudos epidemiológicos, de virulência, e de resistência nas espécies do gênero (BALSALOBRE, 2009).

Muitos estudos têm sido realizados para caracterizar o gênero *Aeromonas* e para obter um quadro definitivo de identificação. Mas apesar destes esforços, a identificação de algumas espécies é ainda um sério problema, pois muitas vezes, espécies de *Aeromonas* são erroneamente confundidas com *E. coli* e *Vibrio* spp (ABBOTT et al., 1998). Outro fator preocupante é que os esquemas bioquímicos atualmente utilizados

nos laboratórios clínicos foram desenvolvidos antes da descrição de novos grupos taxonômicos (ABBOTT, CHEUNG e JANDA, 2003).

Sistemas comerciais têm sido utilizados para a identificação de *Aeromonas*, mas não se sabe quão próximo os resultados são daqueles obtidos pela metodologia convencional e identificações errôneas têm sido descritas (ABBOTT, CHEUNG e JANDA, 2003; SUREK et al., 2010).

2.2.5 Identificação Molecular

Uma alternativa para a identificação de *Aeromonas* é a utilização de ensaios moleculares, que permitem uma identificação mais refinada das espécies, destacando discrepâncias na identificação bioquímica dos isolados ambientais e clínicos (PUTHUCHEARY, PUAH e CHUA, 2012).

As técnicas moleculares têm sido desenvolvidas para superar os problemas apresentados na identificação bioquímica, porém limitações nestas técnicas também ocorrem. Como exemplo, muitas das sondas de DNA específicas para *Aeromonas* têm um espectro estreito que permite a identificação de apenas uma única espécie (PARKER e SHAW, 2011).

O sequenciamento do gene 16S rRNA é a técnica mais utilizada para a identificação molecular de gênero e espécie de bactérias. Mas para o gênero *Aeromonas* não apresenta discriminação adequada devido à heterogeneidade intra-genômica observada nos operons de 16S rRNA (JANDA e ABBOTT, 2010; MARTINO et al., 2011; PUTHUCHEARY, PUAH e CHUA, 2012). O sequenciamento dos genes *rpoD* e *gyrB* também tem sido utilizados para a identificação de *Aeromonas* e permite melhor discriminação das espécies (PARKER e SHAW, 2011).

2.2.6 Suscetibilidade aos antimicrobianos

A resistência aos antimicrobianos entre os patógenos entéricos é um problema grave nos países em desenvolvimento, onde existe uma elevada frequência de doença gastroentérica e muitos antibióticos são usados inadequadamente. A resistência aos antibióticos é particularmente relevante em espécies patogênicas do gênero *Aeromonas* em que, além da resistência aos antibióticos β -lactâmicos clássicos, mediada por β -lactamases, a resistência múltipla tem sido frequentemente identificada (GUERRA et al., 2007; BALSALOBRE, 2009; PARKER e SHAW, 2011).

Pereira e colaboradores (2008) analisando 56 *Aeromonas* isoladas de swab retal de recém-nascidos que apresentaram diarreia, verificaram que 27% apresentaram perfil de resistência e multirresistência aos antimicrobianos. Tais bactérias pertenciam às seguintes espécies: *A. caviae*, *A. media*, *A. veronii* bv sobria, *A. veronii* bv veronii, *A. hydrophila* e *A. schubertii*. Essas espécies apresentaram diferentes perfis frente ao teste de suscetibilidade aos antimicrobianos merecendo destaque *A. caviae* (resistência à tetraciclina, cefalotina e cefoxitina) e *A. veronii* biovar veronii (resistência ao sulfametoxazol-trimetoprim, cloranfenicol, ácido nalidíxico e tetraciclina). Também os perfis de resistência observados para *A. schubertii*, *A. caviae* e *A. veronii* biovar veronii para cefalosporinas de terceira geração são de interesse clínico.

Em ampla revisão, Janda e Abbot (2010) descreveram o perfil de suscetibilidade geral do gênero *Aeromonas* a classes de antibióticos específicos, destacando como mais comum a resistência aos antifolatos, cefalosporinas de espectro estreito, penicilinas e macrolídeos. Também descrevem a resistência, em menor frequência, aos aminoglicosídeos e cefalosporinas de amplo espectro. No entanto, este quadro deve ser visto apenas como uma base geral para o gênero, uma vez que as porcentagens de resistência a drogas podem variar significativamente dentro de cada uma das espécies, localidades geográficas ou devido a pressões de seleção ambiental (JANDA e ABBOT, 2010).

2.3 RESISTÊNCIA À BILE

Para sobreviver no trato gastrointestinal, os micro-organismos precisam resistir a inúmeras condições ambientais extremas (BEGLEY, GAHAM e HILL, 2005). Após a ingestão da bactéria, a caminho do cólon, estas encontram diversas adversidades, incluindo variações no pH, os ácidos gástricos no estômago, baixos níveis de oxigênio, limitação de nutrientes, elevada osmolaridade e a bile no intestino delgado, que constituem potenciais barreiras para a sua sobrevivência.

A bile é uma secreção digestiva importante para a emulsificação e digestão de lipídeos, cuja composição está descrita na tabela 2 (BEGLEY, GAHAM e HILL, 2005, adaptado de BOUCHIER, 1982).

TABELA 2. Constituintes da bile

Constituinte	Concentração
Sódio (mmol/L)	145
Potássio (mmol/L)	4
Cloreto (mmol/L)	90
Sais biliares (mmol/L)	40
Colesterol (mmol/L)	3
Fosfolipídios (mmol/L)	7
Peso seco (mg/mL)	20
Osmolaridade (mOsm/L)	280
pH	7,5-8,0

Nos seres humanos, desoxicolato de sódio (NaDOC), quenodesoxicolato (NaCDC), ursodesoxicolato (NaUDC) e glicocolato (NaGIC) são os sais biliares mais importantes presentes no intestino, sendo o NaDOC aquele encontrado em maior concentração na água fecal (87-247 μ M) (VAN FAASSEN et al., 1993; BERNSTEIN et al., 1999). A concentração de sais biliares no intestino delgado varia, dependendo do indivíduo e tipo e quantidade de alimento ingerido, de aproximadamente 0,2 a 2% (p/v) (DAWSON, 1998, citado por KRISTOFFERSEN et al., 2007); segundo DEEST et al., (1968) de 1,9 a 5,9 mg/mL; e conforme NORTHFIELD e MCCOLL (1973), a concentração média, pós-prandial, dos ácidos biliares totais no intestino delgado varia de 2 mM a 10 mM, dependendo sítio analisado, e a concentração de ácidos biliares livres de 0,25 mM a 1 mM (μ mol/mL).

Os sais biliares atuam como detergentes na digestão de gorduras, com a capacidade de afetar fosfolipídios e proteínas de membranas celulares, perturbando a homeostase celular, fazendo com que atue como potente antimicrobiano. Deste modo, a tolerância de agentes patogênicos à bile é importante para a sua sobrevivência e subsequente colonização do trato gastrointestinal (GUNN, 2000; BEGLEY, GAHAM e HILL, 2005; ESTELLER, 2005).

As bactérias monitoram continuamente os parâmetros ambientais durante a colonização ou infecção do hospedeiro expressando genes que ajudam na sobrevivência e reprimindo aqueles que são desnecessários. Os mecanismos utilizados pelas bactérias para detectar e responder a bile ainda são pouco conhecidos, mas são possivelmente semelhantes aos utilizados para outras respostas de estresse. Considerando a natureza complicada deste estresse, a habilidade de um organismo tolerar a bile presumivelmente requer um amplo número de proteínas, incluindo muitas que controlam a arquitetura do

envelope celular ou a manutenção da homeostasia intracelular. Proteínas que captam ou expulsam bile, ou enzimas que modificam e transformam os sais biliares provavelmente também desempenham papéis importantes na resistência à bile (BEGLEY, GAHAM e HILL, 2005).

Estudos realizados em *Escherichia coli* indicam que os ácidos biliares induzem a expressão de genes específicos de resposta ao estresse específicos, possivelmente em resposta a perturbação da membrana, ao estresse oxidativo e danos no DNA. A expressão de genes de resposta alterada pelo estresse pode também promover a interação de *E. coli* com as células do epitélio do cólon (BERNSTEIN et al., 1999). Estudo sobre o impacto do estresse causado por exposição a baixo pH e aos sais biliares em *E. coli* enteropatogênica (EPEC) mostrou um significativo aumento da adesão de EPEC às células hospedeiras (JESUS et al., 2005), etapa importante na colonização.

Prouty e colaboradores verificaram que a interação de *Salmonella typhimurium* com o DOC resulta no aumento da resistência à bile e outros agentes antimicrobianos (PROUTY et al., 2004).

O efeito dos sais biliares em *Aeromonas* ainda não foi estudado.

2.4 SEQUENCIAMENTO GENÔMICO

O número de sequências genômicas completas tem aumentado rapidamente, devido a disponibilidade de sequenciadores de nova geração, e já superou a marca de 1000 genomas sequenciados. Devido a essa imensa quantidade de dados gerados em inúmeros laboratórios de todo o mundo, faz-se necessário organizá-los de maneira acessível, de modo a evitar redundância na pesquisa científica e possibilitar a análise por um maior número possível de cientistas. O National Center for Biotechnology Information (NCBI), ou Centro Nacional para Informação Biotecnológica dos EUA, é considerado o banco de dados central sobre informações genômicas. O *GenBank* é o principal banco de dados do NCBI e armazena todas sequências disponíveis publicamente de DNA (de sequências pequenas a genomas inteiros), RNA e proteínas. Estas sequências são ferramentas importantes para o conhecimento a respeito da composição genética dos microrganismos patogênicos e a percepção sobre como podem ser controlados. O método automatizado de Sanger é considerado uma tecnologia de sequenciamento de primeira geração, sendo os novos métodos referenciados como Sequenciamento de Nova Geração (NGS). As tecnologias NGS incluem vários métodos

que diferem, de modo geral, na forma de preparação da molécula alvo, sequenciamento, captura de imagem e análise dos dados. A combinação única de protocolos específicos distingue uma tecnologia da outra e determina o tipo de dado produzido por cada plataforma. Possuem como características em comum e grande vantagem a economia de tempo e custos, gerando quantidades de informação muito maiores que o sequenciamento de Sanger (METZKER, 2010).

Uma das características das tecnologias NGS é a substituição da clonagem dos fragmentos de DNA pela imobilização desses seguida da amplificação e análise sequencial. Uma das tecnologias de NGS amplamente utilizada é baseada na reação de pirosequenciamento. Esta metodologia é utilizada no sequenciador 454 GS Junior System (Roche®). O custo acessível para o sequenciamento de genomas inteiros, simplicidade na geração de bibliotecas e operação do equipamento e a grande quantidade de dados gerados tornaram essa tecnologia uma escolha atrativa para projetos de sequenciamento de genomas bacterianos (MAVROMATIS et al., 2012).

O pirosequenciamento é um método não-eletroforético que emprega uma técnica de sequenciamento bioluminescente baseada em sequenciamento por síntese, emergiu como uma ferramenta amplamente aplicável para a caracterização detalhada de ácidos nucleicos. Baseia-se na detecção em tempo real de pirofosfato inorgânico (PPi) liberado a partir da incorporação de nucleotídeos durante a síntese de DNA, convertendo-o proporcionalmente em luz visível por meio de uma série de reações enzimáticas. O PPi é convertido à adenosina trifosfato (ATP) pela ATP sulfúrilase, e o ATP gerado é captado pela luciferase que produz fótons. ATPs e dNTPs não utilizados são degradados pela enzima apirase. A presença ou a ausência de PPi, e portanto a incorporação ou não de cada nucleotídeo adicionado, é avaliada com base na detecção ou não de fótons (ELAHI e RONAGHI, 2004).

Antes do início das reações de pirosequenciamento, amplicons são gerados por PCR, na qual um dos *primers* é biotinilado na extremidade 5'. Os produtos da reação de PCR, DNA dupla fita biotinilado, são ligados à uma superfície sólida recoberta com estreptavidina e desnaturados. As duas fitas são separadas, e a fita ligada à superfície sólida é utilizada como molde. Após a hibridização de um *primer* de sequenciamento à esta fita, a síntese de DNA sob condições da reação de pirosequenciamento é iniciada. Nesta, 1 pmol da molécula molde de DNA pode gerar o mesmo número de moléculas

de ATP por nucleotídeo incorporado, o qual pode gerar mais de 6×10^9 fótons detectados em um comprimento de onda de 560nm (ELAHI e RONAGHI, 2004).

Dentre as novas plataformas de sequenciamento disponíveis, uma das mais utilizadas é a plataforma 454 GS System (Roche®). Utiliza a reação de PCR em emulsão (emPCR) para preparar as sequências a serem analisadas em um sistema livre de células. Uma biblioteca de fragmentos alvo é criada, a amplificação clonal resulta em uma população de moléculas alvo idênticas que serão submetidas à reação de sequenciamento.

Adaptadores contendo sítios universais para ligação de iniciadores são ligados às extremidades da molécula alvo, permitindo que genomas complexos sejam amplificados com iniciadores comuns para PCR. Após a ligação, o DNA é desnaturado em fitas simples e capturado por microesferas sob condições que favorecem a ligação de uma molécula de DNA por microesfera. Após a amplificação bem sucedida e o enriquecimento das microesferas da emPCR, milhões destas são depositadas em poços individuais em placas denominadas PicoTiterPlate® (MARGULIES et al., 2005; MAVROMATIS et al., 2012).

Baseada na tecnologia de pirosequenciamento, a plataforma 454 GS utiliza o fluxo cíclico de nucleotídeos sobre a placa PicoTiterPlate, composta por aproximadamente 1 milhão de poços, cada qual contendo uma microesfera transportando um único fragmento de DNA fita simples à ser sequenciado. Em cada ciclo, ocorre a adição de um único dNTP em quantidades limitadas. Quando o fluxo de nucleotídeos é complementar ao DNA molde presente num poço, a fita é estendida com nucleotídeos adicionados pela DNA polimerase. Assim, mediante a incorporação do dNTP complementar, a DNA polimerase estende a fita e pausa. Esta hibridização resulta em uma reação que gera um sinal luminoso que é captado por uma câmera. Se houver a incorporação de mais de um nucleotídeo, a intensidade da luz é convertida em um valor de fluxo que designa o número de nucleotídeos incluídos (BALZER et al., 2014).

A síntese de DNA é reiniciada seguindo a adição do próximo dNTP complementar no ciclo de distribuição. A ordem e a intensidade dos picos luminosos são registradas como “flowgrams”, os quais revelam a sequência de DNA examinada (METZKER, 2010).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a variabilidade metabólica de estirpes de *Aeromonas* quanto à utilização de fontes de carbono, determinar a sequência de nucleotídeos do genoma de *A. veronii* bv sobria e analisar sua resposta frente à bile.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a capacidade de isolados clínicos de *Aeromonas* utilizarem diferentes fontes de carbono;
- Analisar a variabilidade das estirpes quanto à utilização de fontes de carbono;
- Verificar se os achados relativos à utilização das fontes de carbono permitem a diferenciação das estirpes ao nível de espécie;
- Determinar a sequência de nucleotídeos do genoma de *A. veronii* bv sobria;
- Realizar a montagem do genoma de *A. veronii* bv sobria;
- Realizar a anotação do genoma;
- Analisar a resposta de *A. veronii* bv sobria frente ao sal biliar desoxicolato de sódio.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRA

4.1.1 Utilização de fontes de carbono

Para a realização dos ensaios de utilização de fontes de carbono foram analisadas 111 estirpes de *Aeromonas* previamente isoladas de amostras clínicas humanas e caracterizadas através do perfil bioquímico utilizando os métodos microbiológicos convencionais. As estirpes fazem parte da bacterioteca do Laboratório de Bacteriologia Clínica do departamento de Análises Clínicas da UFPR, e foram mantidas em meio Cary-Blair, sob refrigeração. A tabela 3 mostra informações sobre as estirpes analisadas. Exceto pelas estirpes AT 1999, 49H, U1 e AH F1-F3, que foram isoladas de líquido céfalo-raquiano, sangue, urina e ferida, respectivamente, as demais foram isoladas de fezes de pessoas com diarreia.

TABELA 3. Estirpes de *Aeromonas* analisadas

Espécie	Numero de estirpes	Fonte
<i>A. veronii</i> bv sobria	12	VIZZOTTO, 2009; SUREK et al., 2010
<i>A. trota</i>	03	VIZZOTTO, 2009.
<i>A. hydrophila</i>	19	VIZZOTTO, 2009; PREDIGER et al, 2012; ASSIS et al., 2014
<i>A. caviae</i>	64	VIZZOTTO, 2009; SUREK et al., 2010; PREDIGER et al., 2012
<i>Aeromonas</i> spp.	13	VIZZOTTO, 2009 PREDIGER et al., 2012; ASSIS et al., 2014

4.1.2 Sequenciamento do genoma e interação com o sal biliar desoxicolato de sódio

Apenas a estirpe *A. veronii* bv sobria 312M, isolada de fezes, teve o genoma sequenciado e foi utilizada nas análises de interação com o sal biliar.

4.2. UTILIZAÇÃO DE FONTES DE CARBONO

4.2.1 Condições de cultivo

As estirpes foram inoculadas em ágar triptona de soja (TSA; Becton, Dickinson and Co., Le Pont de Claix, France) para reativação, verificação da pureza da cultura e das características coloniais. A incubação foi realizada por aproximadamente 18 horas a 36°C. As estirpes foram re-inoculadas em TSA e incubadas como descrito acima para então serem testadas quanto à capacidade de utilizar fontes de carbono.

4.2.2 Biolog®

Para determinar a capacidade de utilizar fontes de carbono foram utilizadas as microplacas GN2 (Biolog®, Cabot Boulevard Hayward, USA), que contém 95 fontes de carbono e um poço controle, como indicado na Figura 1.

1 Água	A2 A- Ciclodext rina	A3 Dextrina	A4 Glicogêni o	A5 Tween 40	A6 Tween 80	A7 N-Acetil- D- galactosa mina	A8 N-Acetil- D- glucosami na	A9 Adonitol	A10 L- Arabinose	A11 D-Arabitol	A12 D- Celobiose
B1 i-Eritritol	B2 D-Fructose	B3 L-Fucose	B4 D- Galactose	B5 Gentiobio se	B6 α -D- Glucose	B7 m-Inositol	B8 α -D- Lactose	B9 Lactulos e	B10 Maltose	B11 D-Manitol	B12 D- Mannose
C1 D-Melibiose	C2 β -Metil- D- Glucosíde o	C3 D-Psicose	C4 D- Rafinose	C5 L- Rhamnose	C6 D- Sorbitol	C7 Sacarose	C8 D-Trealose	C9 Turhanose	C10 Xilitol	C11 Metilpiruv ato	C12 Mono- Metil- Succinato
D1 Ácido Acético	D2 Ácido Cis- Aconítico	D3 Ácido Cítrico	D4 Ácido Fórmico	D5 Ácido D- galactônico o lactona	D6 Ácido D- Galacturô nico	D7 Ácido D- Glucônico	D8 Ácido D- Glucosamí nico	D9 Ácido D- Glucurô nico	D10 Ácido α - Hidroxibut írico	D11 Ácido β - Hidroxibut írico	D12 Ácido γ - Hidroxibut írico
E1 Ácido p- hidroxifenila cético	E2 Ácido itaconico	E3 Ácido α - cetobutíric o	E4 Ácido α - Cetoglutá rico	E5 Ácido α - Cetovaléri co	E6 Ácido D,L- Lático	E7 Ácido Malônico	E8 Ácido propionico	E9 Ácido quinico	E10 Ácido D- sacárico	E11 Ácido sebáico	E12 Ácido succínico
F1 Ácido bromo succínico	F2 Ácido succinâmico	F3 Glucurona mida	F4 L- Alaninam ida	F5 D-Alanina	F6 L-Alanina	F7 L-Alanil- glicina	F8 L- Asparagin a	F9 Ácido L- Aspártico	F10 Ácido L- Glutâmico	F11 Ácido Glicil-L- Aspártico	F12 Ácido Glicil-L- Glutâmico
G1 L-Histidina	G2 Hidroxi- L-Prolina	G3 L-Leucina	G4 L- Ornitina	G5 Fenilalanina	G6 L-Prolina	G7 Ácido L- Piroglutá mico	G8 D-Serina	G9 L-Serina	G10 L-Treonina	G11 D,L- Carnitina	G12 Ácido γ - Aminobutí rico
H1 Ácido Urocânico	H2 Inosina	H3 Uridina	H4 Timidina	H5 Feniletilamina	H6 Putrescina	H7 2- Aminoetanol	H8 2,3- Butanodiol	H9 Glicerol	H10 D,L- α - Glicerol fosfato	H11 Glucose-1- Fosfato	H12 Glucose-6- Fosfato

FIGURA 1. Fontes de carbono nas microplacas Biolog GN2.

Fonte: BIOLOG (www.biolog.com)

Para a realização do teste as bactérias foram cultivadas em TSA, e colônias isoladas foram utilizadas para preparar uma suspensão, em NaCl 0,9% estéril, com turbidez equivalente ao tubo 1,2 da escala nefelométrica de McFarland.

Em seguida, alíquotas de 150 μ l da suspensão de bactérias foram inoculadas em cada um dos 96 poços da microplaca Biolog® GN2, a qual foi incubada a 36°C, em câmara úmida. As leituras foram realizadas visualmente após 24 e 48 horas de

incubação, e o desenvolvimento de coloração púrpura nos poços foi considerado como reação positiva para o respectivo substrato. Os testes foram realizados em duplicata para cada estirpe.

4.2.3 Análise estatística

A análise dos perfis metabólicos foi realizada utilizando o programa NTSYSpC 2.2 (Numeral Taxonomy and Multivariate Analysis System) (Exeter Software, USA), com o coeficiente de similaridade de Dice (DICE, 1945). O mesmo programa foi utilizado para construir um dendrograma baseado na análise de *clusters* UPGMA (Unweighted Pair group Method using Arithmetic Average) (SNEATH e SOKAL, 1973).

As análises de componentes principais (PCA) para determinar os substratos para distinguir as espécies de *Aeromonas* foram realizadas utilizando-se o programa *PLS-Toolbox* 6.5 (Eigenvector Technologies, Manson, USA), operando em ambiente *Matlab* 7.13 (The Math-Works, Natick, USA).

4.3 SEQUENCIAMENTO DO DNA GENÔMICO

4.3.1 Condições de cultivo

O cultivo da estirpe *A. veronii* bv sobria 312M foi realizado em ágar nutriente, a partir da semeadura de uma alíquota do estoque bacteriano, e incubado *overnight* a 36°C. As colônias foram então analisadas quanto à morfologia colonial e pureza. Uma colônia isolada foi analisada microscopicamente pelo Gram, para confirmação da morfologia e reação tintorial características de *Aeromonas*, e também quanto à atividade de citocromo oxidase.

4.3.2 Isolamento e quantificação do DNA genômico

O DNA genômico da bactéria foi purificado utilizando o “High Pure PCR Template Preparation kit” (Roche®) conforme instruções do fabricante. A concentração de DNA foi determinada utilizando o kit “Quant-it Pico Green dsDNA assay”

(Invitrogen®) e o Fluorímetro GloMax®-Multi+Detection System com Software Instinct (Promega®).

4.3.3 Sequenciamento do DNA genômico da estirpe *A. veronii* bv sobria 312M

4.3.3.1 Construção da biblioteca genômica

Para a construção da biblioteca universal contendo os fragmentos de DNA, foram utilizados os kits *GS Rapid Library Prep Nebulizers*, *GS Rapid Library Reagents*, *Buffers and Adaptors* (Roche®). A biblioteca consiste de uma coleção de fragmentos de DNA fita simples representando a sequência completa da amostra. Cada fragmento é flanqueado por adaptadores que permitem a amplificação, e a posterior purificação e quantificação do DNA a ser sequenciado.

A primeira etapa consistiu da fragmentação do DNA, realizada por nebulização. Uma solução contendo 500ng da amostra de DNA foi adicionada de Tampão TE para um volume de 100 µL, os quais foram pipetados no interior do aparato de nebulização. À mistura foram adicionados 500 µL do Tampão de Nebulização com sucessiva homogeneização, o nebulizador foi conectado ao cilindro de nitrogênio e foi aplicada pressão de 30 psi (2.1 bar) do gás por 1 minuto. Decorrido este tempo, foram adicionados 2,5mL do Tampão PBI à amostra, seguido de homogeneização e purificação da amostra de DNA nebulizada em coluna de sílica utilizando o Qiagen MinElute PCR Purification Kit (Qiagen®).

Em seguida, a amostra contendo os fragmentos de DNA purificados foi submetida às etapas de reparo das extremidades, ligação dos adaptadores e remoção dos pequenos fragmentos. A biblioteca de DNA foi quantificada em fluorímetro Promega Glomax MultiDetection System e os filtros de 490 nm (excitação) e 510-570 nm (emissão) e então foram preparadas alíquotas de trabalho na concentração de 1×10^7 moléculas/µl em tampão TE. A qualidade da biblioteca foi determinada utilizando-se o sistema *Flash Gel Dock System* (Lonza®).

4.3.3.2 PCR em emulsão (emPCR)

Após o preparo da biblioteca de fragmentos, segue-se a etapa de amplificação clonal baseada em PCR em emulsão (emPCR), que foi realizada utilizando-se o *GS*

Junior emPCR Kit (Lib-L) (Roche®). Consiste na amplificação da biblioteca de fragmentos de DNA isolados, formando dezenas de milhares de cópias por esfera.

Inicialmente, procedeu-se ao preparo dos reagentes, do óleo de emulsão e misturas de amplificação segundo protocolo do fabricante. Em seguida, foram adicionadas à biblioteca de DNA as esferas de captura e a mistura de amplificação, para o preparo da emulsão final, mediante homogeneização em *Ika Turrax* (Roche®) a 2000 rpm por 5 minutos.

A emulsão foi transferida para placa de 96 poços, levada ao termociclador e submetida à reação de amplificação, seguindo os parâmetros: 1 ciclo de 4 minutos à 94°C, 50 ciclos de 94°C por 30 segundos, 58°C por 4 minutos e 30 segundos e 68°C por 30 segundos, finalizando com 10°C em aguardo. Então as esferas contendo o DNA amplificado foram coletadas em tubo de 50 mL com auxílio de bomba de vácuo, seguido de etapas de lavagem com etanol (Merk®) e isopropanol (Sigma Aldrich®).

Posteriormente foi realizada a desnaturação das fitas e o enriquecimento das esferas contendo os fragmentos de DNA, utilizando o kit *Bead Recovery Reagents* (Roche), e a adição dos *primers* de sequenciamento. Então é determinada a concentração das *beads* utilizando o “Bead Counter v2”.

4.3.3.3 Pirosequenciamento

Para determinar a sequência de nucleotídeos da biblioteca de fragmentos de DNA imobilizados e clonalmente amplificados utilizou-se o equipamento 454 *GS Junior System* (Roche®) em combinação com *GS Junior Titanium Sequencing Kit* (Roche®) e *GS Junior Titanium PicoTiterPlate Kit* (Roche®).

No processo de pirosequenciamento, os sinais quimioluminescentes são registrados pela câmera CCD acoplada ao equipamento durante todo o processo, em tempo real, para identificar os poços contendo DNA molde e avaliar as intensidades dos sinais associados à inserção dos nucleotídeos complementares.

Resumidamente, aproximadamente 500.000 esferas contendo DNA são transferidas para a placa de sequenciamento “PicoTiterPlate” previamente preparada, e então são adicionados a mistura de enzimas do kit *GS Junior Reagents and Enzymes* (Roche®) e *beads* de acondicionamento que são depositadas em camadas sobre os poços no dispositivo PicoTiterPlate. O dispositivo é inserido no Sequenciador 454 *GS Junior* (Roche®), e os reagentes do *GS Junior Titanium Sequencing Kit Buffers*

(Roche®) são, de forma ordenada, adicionados sobre a placa. Informações das reações em todos os poços são capturadas pela câmera. Os dados brutos consistem de uma coleção de imagens digitais a partir das quais a sequência de nucleotídeos dos fragmentos da biblioteca de DNA é determinada pelo computador auxiliar.

4.3.3.4 Montagem e Anotação do Genoma

As sequências obtidas foram montadas utilizando o software Newbler (454 *runAssembly software*, versão 1.1.02.15).

A anotação do genoma foi realizada com o "Rapid Annotation using Subsystem Technology" (RAST), versão 2.0, um sistema automatizado para a anotação de genomas bacterianos (AZIZ et al., 2008; OVERBEEK et al., 2014).

4.4 INTERAÇÃO COM O SAL BILIAR DESOXICOLATO DE SÓDIO (doc)

4.4.1 Crescimento na ausência e presença de DOC

A estirpe *A. veronii* bv sobria 312M foi cultivada em TSA e colônias isoladas foram utilizadas para preparar suspensões bacterianas com turbidez equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland que corresponde a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia/mL (UFC/mL). A partir dessas suspensões foram preparadas diluições seriadas, em água estéril. Quinhentos microlitros das suspensões contendo aproximadamente 10^3 e 10^2 UFC/mL foram transferidos para placas de Petri contendo TSA (controle) e TSA adicionado de 24 μ M e 240 μ M. As placas foram incubadas a 36°C por 24h, e então foi realizada a contagem do número de colônias e observação das características morfológicas.

A escolha das concentrações de DOC foi baseada nas concentrações fisiológicas dos sais biliares encontradas no intestino delgado e grosso (DEEST et al., 1968; NORTHFIELD e MCCOLL 1973; VAN FAASSEN et al., 1993; BERNSTEIN et al., 1999; JESUS et al., 2005; KRISTOFFERSEN et al., 2007).

4.4.2 Análise proteômica

A estratégia empregada para analisar os efeitos do DOC sobre a bactéria foi a análise proteômica, que permite avaliar as alterações no perfil de proteínas expressas por uma célula em resposta às condições as quais é exposta. Os extratos proteicos foram preparados a partir de *A. veronii* bv sobria 312M cultivada na ausência e na presença de 240 μ M de DOC. A metodologia utilizada foi a eletroforese bidimensional (2D), mas também foram realizadas análises preliminares através de SDS-PAGE.

4.4.2.1 Preparo do extrato proteico celular

Foi realizado um choque com DOC, na concentração de 240 μ M, em que as bactérias foram cultivadas em BHI e incubadas a 36°C *overnight*. Então a DO₆₀₀ da cultura foi determinada, e uma alíquota da mesma foi transferida para um erlenmeyer contendo 200 mL de BHI de modo a obter um inóculo com DO inicial de 0,05. A cultura foi novamente incubada a 36°C por cerca de 3 horas e então, volumes de 100 mL da cultura foram transferidos para 2 erlenmeyers identificados como controle e teste. Ao frasco teste foi adicionado volume de DOC suficiente para obter a concentração de 240 μ M e ao frasco controle o mesmo volume de água estéril e os erlenmeyers foram novamente incubados nas mesmas condições durante 90 minutos.

Procedeu-se então ao preparo do extrato proteico celular que foi realizado conforme descrito no manual *Two-Dimensional Electrophoresis* (GÖRG et al., 2007).

Os erlenmeyers contendo as culturas controle e teste foram retirados da estufa e colocados em banho de gelo. Para a análise de SDS-PAGE (extrato direto) uma alíquota de 1 mL foi retirada das culturas controle e teste e centrifugada a 14000 rpm por 5 minutos; ao sedimento, adicionou-se 100 μ L de água destilada e tampão 5X (Tris-HCl pH 6,8 60mM, glicerol 25%, SDS 2%, 2-mercaptoetanol 14,4mM, 0,1% de azul de bromofenol). Em seguida, a amostra foi aquecida a 95°C por 5 minutos e centrifugada novamente (14000 \times g por 5 minutos). O sobrenadante corresponde ao extrato direto.

Para o preparo do extrato proteico utilizado na eletroforese 2D, a cultura restante nos erlenmeyers foi transferida para tubos com capacidade de 50mL, centrifugada a 800 \times g por 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram desprezados e os sedimentos de células foram lavados 2 vezes com tampão de lavagem (KCl 3mM/L, KH₂PO₄ 1,5mM/L, NaH₂PO₄ 9,0mM/L e NaCl 68mM/L), e então com tampão de ressuspensão (Tris pH 8,0 10 mM/L). Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, e o sedimento foi ressuspensão no volume residual do tampão e então acrescido de 500 μ L

de tampão de lise (Ureia 7M, Tiourea 2M, CHAPS 4% [p/v], IPG Buffer 2% [v/v], DTT 40 mM, 1% de inibidor de protease). Em seguida, a cada 100 µl de amostra foi adicionado 1 µl de “Protease Inhibitor” e 1 µl de Nuclease Mix (GE Healthcare). A mistura foi mantida a temperatura ambiente por 1 hora, e então congelada (-20°C). Posteriormente as amostras, em banho de gelo, foram submetidas à sonicação (5 pulsos de 20 segundos, com intervalos de 30 segundos), e centrifugadas a 12000×g por 15 minutos a 4°C para retirar os restos celulares. Os sobrenadantes obtidos foram aliquotados e armazenados a -20°C para uso subsequente em eletroforese bidimensional.

4.4.3.3 Quantificação de proteínas

Para a quantificação de proteínas foi empregado o kit 2-D Quanti (GE Healthcare), que baseia-se na ligação específica de íons de cobre às proteínas. As proteínas são precipitadas e então ressuspensas em uma solução que contém cobre. O cobre não ligado é medido com um agente colorimétrico. A intensidade de cor é inversamente proporcional à concentração de proteína. O ensaio tem uma resposta linear à proteína na faixa de 0-50 ug.

4.4.3.4 Eletroforese SDS-PAGE

Para realização dos géis de eletroforese SDS-PAGE, utilizou-se 15 µL do extrato direto de proteína em tampão 5X, que foram previamente aquecidos a 95°C por 5 minutos e em seguida aplicados em gel de poliacrilamida 12%. A corrida eletroforética foi realizada a 120 V, por cerca de 2 horas. Os géis foram corados com PhastGel Blue R 0,1% (GE Healthcare) por 24 h e, em seguida, descorados (solução metanol/ácido acético/água [3:1:6]).

4.4.3.5 Eletroforese bidimensional (2D)

A realização dos géis de eletroforese 2D foi baseada no protocolo recomendado no manual Two-Dimensional Electrophoresis (GÖRG et al., 2007). O processo inclui a primeira dimensão que corresponde à isoeletrofocalização (IEF) das proteínas, realizada em tiras de gel de 13 cm com gradiente imobilizado de pH 4-7 (GE Healthcare). Para isso, 375 µg do extrato proteico em 250 µL de tampão de reidratação (Ureia 7M, Tiourea 2M, CHAPS 4% [p/v], IPG Buffer 2% [v/v], DTT 40 mM, traços de azul de bromofenol) foram aplicados nas tiras com gradiente imobilizado de pH. A

isoeletrofocalização foi realizada nas seguintes condições: 1º Passo) Re-hidratação ativa 50 V/12 h, 2º Passo) Step Hold 500 V/500Vh, 3º Passo) Gradiente 1000 V/800 Vh, 4º Passo) Gradiente 8000 V/11300 Vh, 5º Passo) Step Hold 8000 V/12000 Vh. A IEF foi realizada em temperatura de 20°C. Após a conclusão da IEF, as fitas foram transferidas para tubos de vidro com tampa de rosca e imediatamente equilibradas.

O equilíbrio das tiras foi realizado em duas etapas. Na primeira etapa, as tiras foram tratadas com 5 ml de solução tampão de equilíbrio (Ureia 6M, Tampão Tris-HCl pH 8,8 50mM, Glicerol 30% [v/v], SDS 2% [m/v], azul de bromofenol 0,002% [m/v], água destilada) e 50 mg de ditioneitol (DTT) durante 30 minutos sob agitação. Na segunda etapa, o DTT foi substituído por 200mg de iodoacetamida e a tira foi mantida por agitação por 30 minutos.

Após o equilíbrio das tiras, estas foram submetidas à eletroforese em segunda dimensão. A eletroforese SDS-PAGE bidimensional foi realizada em géis de 18 cm x 16 cm em cuba Ruby (GE Healthcare). Foi utilizada a solução acrilamida 40%/bisacrilamida (29:1) (GE Healthcare), em proporção adequada para o preparo do gel com concentração de 11,6%. Após a polimerização, as tiras foram colocadas na superfície do gel junto ao marcador de baixo peso molecular (97kDa - 14 kDa) (GE Healthcare) e selados com uma camada de gel de agarose 1,0% em tampão LAEMMLI (250 mM TRIS, 2,5 mM Glicina, 1% SDS).

As corridas foram realizadas nas seguintes condições: voltagem de 300 Volts, potência de 50 W, 5 mA por gel nos primeiros 45 minutos de corrida e após 30 mA por gel, por aproximadamente 2 horas. A temperatura do sistema foi mantida a 12 °C por meio de refrigeração com circulador termostático Multitemp II.

Após a corrida, os géis foram fixados (ácido fosfórico 1%, metanol 20% e água destilada 79%) durante 24h. Posteriormente, foram corados com PhastGel Blue R 0,1% (GE Healthcare) por 24 h e, em seguida, descorados (solução metanol/ácido acético/água [3:1:6]). A imagem dos géis foi obtida utilizando o Imagescaner (Amersham Biosciences) e com auxílio do programa Labscan (GE Healthcare).

A análise dos géis foi realizada com o programa ImageMaster 2D Platinum v.6.0 (Amersham Biosciences), utilizando *smooth* 3 como parâmetros.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CAPACIDADE DE UTILIZAÇÃO DE FONTES DE CARBONO POR ESTIRPES DE *AEROMONAS*

Os ensaios para determinar a habilidade de estirpes de *Aeromonas* em metabolizar fontes de carbono foram realizados utilizando as microplacas Biolog GN2. As microplacas Biolog baseiam-se em testes de oxidação de 95 fontes de carbono incluindo álcoois, compostos poliméricos, açúcares, ácidos orgânicos e aminoácidos, presentes em microplacas com 96 poços. Cada poço contém um corante redox, o violeta de tetrazólio, que é utilizado como repórter do metabolismo. A utilização de uma fonte de carbono é indicada pelo desenvolvimento de coloração púrpura que resulta da oxidação da fonte de carbono e consequente redução do violeta de tetrazólio a formazan púrpura (HOLMES et al., 1994). Com as 95 diferentes fontes de carbono na microplaca, o padrão de reação resulta em poços incolores e púrpura, que definem o perfil metabólico de cada bactéria.

Entre as 95 fontes de carbono testadas 60 apresentaram resultados variáveis entre as estirpes (Tabela 4). Mas todas as estirpes foram capazes de utilizar as seguintes fontes de carbono: dextrina, glicogênio, tween 40, tween 80, N-acetil-D-glucosamina, D-frutose, D-galactose, α -D-glucose, maltose, D-manitol, sacarose, D-trealose, ácido D-glucônico, L-asparagina, ácido L-aspartico, ácido L-glutâmico, ácido glicil-L-aspartico, ácido glicil-L-glutâmico, L-serina e inosina. Estes resultados indicam que as bactérias do gênero *Aeromonas* são capazes de metabolizar várias classes de fontes de carbono, incluindo açúcares (mono-, di-, oligo- e polissacarídeos), álcoois derivados de açúcares, amino-açúcares, aminoácidos e dipeptídeos, e nucleosídeos. Entre estas 20 fontes de carbono utilizadas por todas as estirpes, destacam-se os carboidratos em detrimento dos ácidos orgânicos.

Nas condições de análise todas as estirpes testadas foram incapazes de utilizar os seguintes substratos (15): α -ciclodextrina, adonitol, arabitol, i-eritritol, xilitol, ácido D-galactônico lactona, ácido γ -hidroxibutírico, ácido itacônico, ácido α -cetovaleico, ácido quínico, ácido sebácico, hidroxil-L-prolina, fenilalanina, ácido L-pirolutâmico e feniletilamina.

TABELA 4. Substratos utilizados de forma variável entre as estirpes*

Fonte de Carbono	<i>A. caviae</i> (n=64)	<i>A. hydrophila</i> (n=19)	<i>A. veronii</i> bv sobria (n=12)	<i>A. trota</i> (n=3)	<i>Aeromonas</i> spp (n=13)
N-Acetil-D-Galactosamina	9 (14%)	15 (79%)	4 (33%)	0 (0%)	8 (62%)
<u>L-Arabinose</u>	57 (89%)	14 (74%)	2 (17%)	1 (33%)	6 (46%)
<u>D-Celobiose</u>	44 (69%)	4 (21%)	6 (50%)	2 (67%)	6 (46%)
L-Fucose	2 (3%)	0 (0%)	1 (8%)	0 (0%)	1 (8%)
<u>Gentiobiose</u>	34 (53%)	2 (11%)	1 (8%)	1 (33%)	2 (15%)
<u>m-Inositol</u>	0 (0%)	0 (0%)	2 (17%)	0 (0%)	1 (8%)
<u>α-D-Lactose</u>	35 (55%)	2 (11%)	42%	1 (33%)	7 (54%)
<u>Lactulose</u>	23 (36%)	0 (0%)	1 (8%)	1 (33%)	5 (38%)
<u>D-Manose</u>	28 (44%)	17 (90%)	12 (100%)	1 (33%)	13 (100%)
<u>D-Melibiose</u>	2 (3%)	1 (5%)	1 (8%)	0 (0%)	3 (23%)
β-Metil-D-Glucosídeo	64 (100%)	19 (100%)	10 (83%)	3 (100%)	13 (100%)
D-Psicose	53 (83%)	13 (68%)	8 (67%)	2 (67%)	10 (77%)
<u>D-Rafinose</u>	11 (17%)	1 (5%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (15%)
<u>D-Rhamnose</u>	2 (3%)	1 (5%)	0 (0%)	0 (0%)	5 (38%)
<u>D-Sorbitol</u>	17 (27%)	5 (26%)	2 (17%)	0 (0%)	6 (46%)
<u>Turanose</u>	11 (17%)	7 (37%)	1 (8%)	0 (0%)	5 (38%)
Metilpiruvato	64 (100%)	18 (95%)	58%	2 (67%)	12 (92%)
Mono-Metil-Succinato	44 (69%)	15 (79%)	2 (17%)	1 (33%)	10 (77%)
Ácido Acético	50 (78%)	13 (68%)	7 (58%)	1 (33%)	10 (77%)
Ácido Cis-Aconítico	8 (13%)	4 (21%)	7 (58%)	1 (33%)	5 (38%)
Ácido Cítrico	4 (6%)	1 (5%)	7 (58%)	1 (33%)	4 (31%)
Ácido Fórmico	17 (27%)	2 (11%)	1 (8%)	0 (0%)	7 (54%)
Ácido D-Galacturônico	28 (44%)	1 (5%)	0 (0%)	1 (33%)	3 (23%)
Ácido D-Glucosamínico	0 (0%)	0 (0%)	1 (8%)	0 (0%)	3 (23%)
Ácido D-Glucurônico	11 (17%)	1 (5%)	2 (17%)	0 (0%)	3 (23%)
Ácido α-Hidroxibutírico	11 (17%)	1 (5%)	0 (0%)	0 (0%)	5 (38%)
Ácido β-Hidroxibutírico	2 (3%)	1 (5%)	2 (17%)	0 (0%)	0 (0%)
Ácido p-Hidroxifenilacético	2 (3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (31%)
Ácido α-Cetobutírico	0 (0%)	0 (0%)	1 (8%)	0 (0%)	4 (31%)
Ácido α-Cetoglutárico	5 (8%)	1 (5%)	1 (8%)	0 (0%)	6 (46%)
Ácido D,L-Lático	55 (86%)	18 (95%)	0 (0%)	1 (33%)	9 (70%)

Continua

Fonte de Carbono	<i>A. caviae</i> (n=64)	<i>A. hydrophila</i> (n=19)	<i>A. veronii</i> bv sobria (n=12)	<i>A. trota</i> (n=3)	<i>Aeromonas</i> spp (n=13)
Ácido Malônico	0 (0%)	0 (0%)	1 (8%)	0 (0%)	3 (23%)
Ácido Propiônico	11 (17%)	8 (42%)	1 (8%)	1 (33%)	7 (54%)
Ácido D-Sacárico	2 (3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (23%)
Ácido Succínico	61 (95%)	19 (100%)	12 (100%)	3 (100%)	13 (100%)
Ácido Bromo Succínico	58 (91%)	19 (100%)	12 (100%)	2 (67%)	13 (100%)
Ácido Succinâmico	10 (16%)	2 (11%)	3 (25%)	0 (0%)	4 (31%)
Glucuronamida	8 (13%)	0 (0%)	2 (17%)	0 (0%)	3 (23%)
L-Alaninamida	28 (44%)	3 (16%)	3 (25%)	1 (33%)	5 (38%)
D-Alanina	58 (91%)	16 (84%)	10 (83%)	2 (67%)	8 (62%)
L-Alanina	63 (98%)	19 (100%)	11 (92%)	3 (100%)	11 (85%)
L-Alanil-glicina	63 (98%)	19 (100%)	12 (100%)	3 (100%)	11 (85%)
L-Histidina	60 (94%)	18 (95%)	6 (50%)	67	10 (77%)
L-Leucina	0 (0%)	0 (0%)	1 (8%)	0 (0%)	3 (23%)
<u>L-Ornitina</u>	37 (58%)	13 (68%)	2 (17%)	0 (0%)	6 (46%)
L-Prolina	36 (56%)	17 (89%)	6 (50%)	0 (0%)	9 (70%)
D-Serina	50 (78%)	18 (95%)	11 (92%)	2 (67%)	13 (100%)
L-Treonina	38 (59%)	13 (68%)	3 (25%)	1 (33%)	8 (62%)
D,L-Carnitina	11 (17%)	2 (11%)	0 (0%)	0 (0%)	7 (54%)
Ácido γ -Aminobutírico	23 (36%)	7 (37%)	2 (17%)	1 (33%)	6 (46%)
<u>Ácido Urocânico</u>	60 (94%)	16 (84%)	6 (50%)	1 (33%)	8 (62%)
Uridina	64 (100%)	18 (95%)	10 (83%)	3 (100%)	11 (85%)
Timidina	62 (97%)	17 (90%)	8 (67%)	2 (67%)	11 (85%)
Putrescina	14 (22%)	5 (26%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (23%)
2-Aminoetanol	8 (13%)	2 (11%)	0 (0%)	0 (0%)	6 (46%)
2,3-Butanodiol	2 (3%)	1 (5%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<u>Glicerol</u>	63 (98%)	19 (100%)	12 (100%)	3 (100%)	13 (100%)
D,L- α -Glicerol fosfato	62 (97%)	19 (100%)	12 (100%)	3 (100%)	12 (92%)
<u>Glucose-1-Fosfato</u>	16 (25%)	16 (84%)	9 (75%)	2 (67%)	9 (70%)
<u>Glucose-6-Fosfato</u>	18 (28%)	16 (84%)	9 (75%)	2 (67%)	9 (70%)

*estão sublinhados substratos que também foram utilizados em outros estudos. Os números representam o número de estirpes e entre parênteses a porcentagem de positivos.

Diversos estudos sobre o perfil bioquímico de *Aeromonas* foram realizados e mostraram que essas bactérias podem utilizar vários carboidratos (ABBOTT et al., 1992; ABBOTT, CHEUNG e JANDA, 2003; MARTIN-CARNAHAN e JOSEPH, 2005; HORNEMAN e ALI, 2011).

Apenas 23 substratos (destacados com sublinhado na Tabela 4, além de adonitol, glucose, maltose, manitol, sacarose e xilitol) dos 95 testados neste estudo foram empregados em outros trabalhos (ABBOTT et al., 1992; ABBOTT, CHEUNG e JANDA, 2003; MARTIN-CARNAHAN e JOSEPH, 2005; HORNEMAN e ALI, 2011) e são representados na sua maioria carboidratos. No entanto, a diversidade entre as metodologias empregadas naqueles estudos e no presente trabalho dificulta ou até mesmo impossibilita a sua comparação. Isto se deve ao fato de que nos estudos citados foram utilizados métodos microbiológicos convencionais para determinar a habilidade de utilizar fontes de carbono, considerada a capacidade de produzir ácido a partir de carboidratos, e a produção de gás a partir da glucose uma vez que este carboidrato é fermentado por todas as estirpes de *Aeromonas*. Há também outras diferenças, como a detecção da atividade da enzima da ornitina descarboxilase naqueles estudos, ao passo que no presente trabalho foi observada a oxidação de fontes de carbono utilizando a redução do tetrazólio como indicador de atividade metabólica.

Além disso, meios complexos que suportam o crescimento ótimo do organismo testado são utilizados para avaliar a produção de ácido a partir do carboidrato adicionado ao meio, enquanto a assimilação é testada em meio mínimo sem nenhuma fonte de carbono, exceto a que será testada (WAUTERS e VANEECHOUTE, 2011). Isto também se aplica ao teste da descarboxilação da ornitina, em cujo meio de cultura peptona e glucose são utilizados entre outros componentes (KONEMAN et al., 2001).

Ainda assim, é possível verificar que ao menos alguns dos testes produziram resultados compatíveis. De acordo com Abbott, Cheung e Janda (2003), a prova do manitol é positiva para 100% de *A. caviae*, 100% de *A. veronii* bv sobria, 96% *A. hydrophila* e 69% de *A. trota*, e resultados positivos foram observados para todas as estirpes aqui analisadas. O mesmo foi observado para maltose, teste para o qual, segundo Abbott, Cheung e Janda (2003), *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. trota* são 100% positivo e *A. veronii* bv sobria, 92%. Em relação à sacarose, segundo os mesmos autores, os resultados esperados para *A. hydrophila*, *A. cavie* e *A. veronii* bv sobria são 100% positivos, no entanto para *A. trota*, esse índice é de 19%. Os resultados deste trabalho mostraram que todas as estirpes analisadas apresentaram reações positivas para sacarose, mas apenas 3 estirpes de *A. trota* foram analisadas. Nenhuma das estirpes analisadas foi capaz de utilizar o adonitol, em acordo com dados da literatura (ABBOTT, CHEUNG e JANDA, 2003).

Resultados similares aos descritos na literatura (ABBOTT et al., 1992; ABBOTT, CHEUNG e JANDA, 2003; MARTIN-CARNAHAN e JOSEPH, 2005; HORNEMAN e ALI, 2011) também foram observados para arabinose e lactose, mas com discrepâncias para *A. trota*.

Para outros substratos, como por exemplo, celobiose, manose, ácido urocânico, foram observadas discrepâncias na frequência de resultados positivos entre os dados da literatura e os obtidos neste trabalho, entre outras espécies também. E em alguns casos, como nos testes de produção de gás a partir de glucose e de ornitina descarboxilase a comparação não é possível.

As discrepâncias podem ser atribuídas, em parte às diferenças metodológicas, mas também ao baixo número de estirpes analisadas. No estudo pioneiro de Abbott, Cheung e Janda (2003), o que apresenta maior impacto na identificação bioquímica de *Aeromonas*, foram analisadas apenas 25 estirpes de *A. caviae*, 25 de *A. hydrophila*, 25 de *A. veronii* bv sobria e 16 *A. trota*. O baixo número de estirpes analisadas pode gerar distorções nos resultados. Além disso, também deve se considerar que as estirpes que estão sendo comparadas apresentam origens geográficas distintas, e é possível que possam apresentar perfis bioquímicos diferentes em relação às provas que são variáveis dentro de uma mesma espécie.

Os perfis metabólicos das estirpes em relação à utilização das fontes de carbono disponíveis nas microplacas Biolog GN2 foram analisados utilizando o programa NTSYSpc 2.2 com o coeficiente de similaridade de Dice e agrupados com base na análise de *clusters* UPGMA. Os resultados estão representados nos dendrogramas de similaridade (Figuras 2 a 5).

A figura 2 representa a similaridade metabólica observada entre as estirpes de *A. caviae* na utilização das fontes de carbono da microplaca GN2.

Dendrograma de similaridade calculado utilizando o coeficiente de Dice e agrupado pelo UPGMA.

O coeficiente de similaridade mínimo é de 0,75 e apenas as estirpes AC 23 e AC 594M apresentam um mesmo perfil. Pode-se observar a separação dessas bactérias em dois grupos principais, num deles se encontra apenas estirpe AC 3C isolada das demais. No segundo grupo há uma subdivisão, num dos subgrupos se encontra somente a estirpe AC 25, e no outro as demais.

A estirpe AC 3C é a única estirpe que foi isolada de paciente residente na cidade de Cascavel. Isto poderia sugerir que a origem geográfica das estirpes pode estar

associada com a variabilidade metabólica, e/ou que estirpes distintas predominam nas diferentes regiões geográficas.

A figura 3 representa os resultados obtidos para *A. hydrophila*.

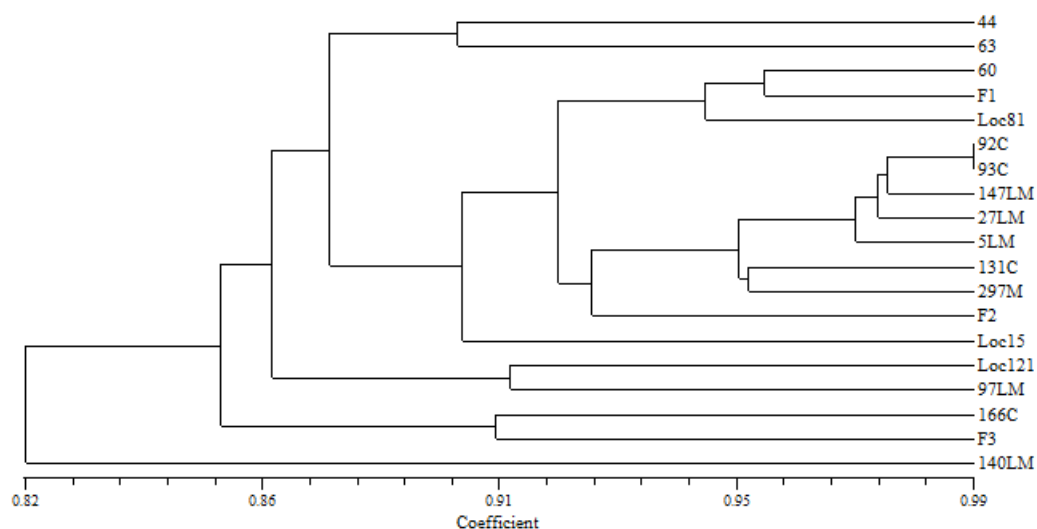


Figure 3. Similaridade do perfil metabólico de estirpes de *A. hydrophila* em relação a utilização de 95 fontes de carbono.

Dendrograma de similaridade calculado utilizando o coeficiente de Dice e agrupado pelo UPGMA.

O coeficiente de similaridade mínimo entre as estirpes de *A. hydrophila* é de 0,82, superior ao observado para *A. caviae*. Isto pode ser decorrente de maior homogeneidade entre as estirpes de *A. hydrophila*, mas também pode ser devido ao menor número de estirpes analisadas pertencentes à essa espécie (19) em relação à *A. caviae* (64).

Há dois grupos principais, um representado apenas pela estirpe AH 140 LM; no outro estão as demais estirpes das quais se destacam AH 166C e AH F3. As estirpes AH F1, F2 e F3 foram isoladas de feridas, mas apresentam perfil metabólico distinto como indicado na Figura 3. As estirpes 92C e 93C, com coeficiente de similaridade de 0,99, apresentam um perfil metabólico muito parecido, variando apenas em relação à utilização da L-arabinose.

A figura 4 representa os resultados obtidos para *A. veronii* bv sobria.

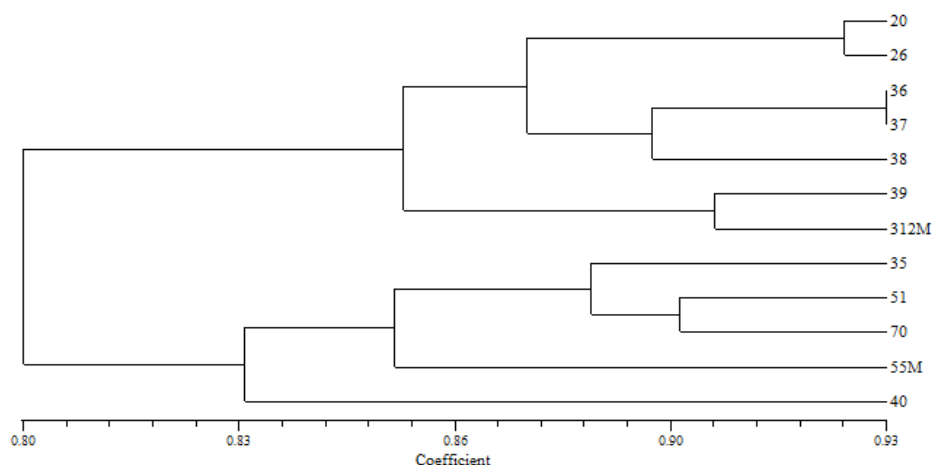


FIGURA 4. Similaridade do perfil metabólico de estirpes de *A. veronii* bv sobria em relação a utilização de 95 fontes de carbono. Dendrograma de similaridade calculado utilizando o coeficiente de Dice e agrupado pelo UPGMA.

Apenas 12 estirpes dessa variedade da espécie de *A. veronii* foram analisadas, observa-se que há 2 grupos principais apresentando aproximadamente 0,83 e 0,85 como coeficiente de similaridade, respectivamente. As estirpes AVS 36 e AVS 37 são as que apresentam perfil metabólico mais próximo, diferindo apenas em relação à resposta aos substratos D-lactose, L-alaninamida e ácido cis-aconítico.

Os resultados para *A. trota* estão indicados na figura 5.

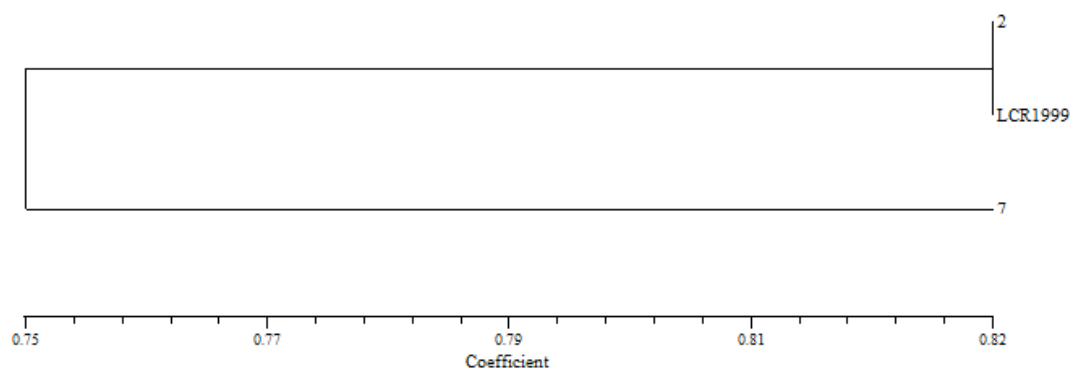


Figure 5. Similaridade do perfil metabólico de estirpes de *A. trota* em relação a utilização de 95 fontes de carbono. Dendrograma de similaridade calculado utilizando o coeficiente de Dice e agrupado pelo UPGMA.

Observa-se que o coeficiente de similaridade varia entre 0,75 e 0,82 entre os isolados de *A. trota* analisados, e nenhuma estirpe compartilha um mesmo perfil. Um dado interessante é que as estirpes que apresentam maior similaridade, AT 2 e AT LCR 1999, foram isoladas respectivamente, a partir de fezes e líquido céfalo-raquidiano. Considerando a origem clínica distinta dos isolados poderia-se esperar que

apresentassem maior variabilidade entre si, que os isolados de uma mesma amostra biológica.

A figura 6 é o dendrograma construído com os resultados do Biolog microplaca GN2 de todas as estirpes analisadas.

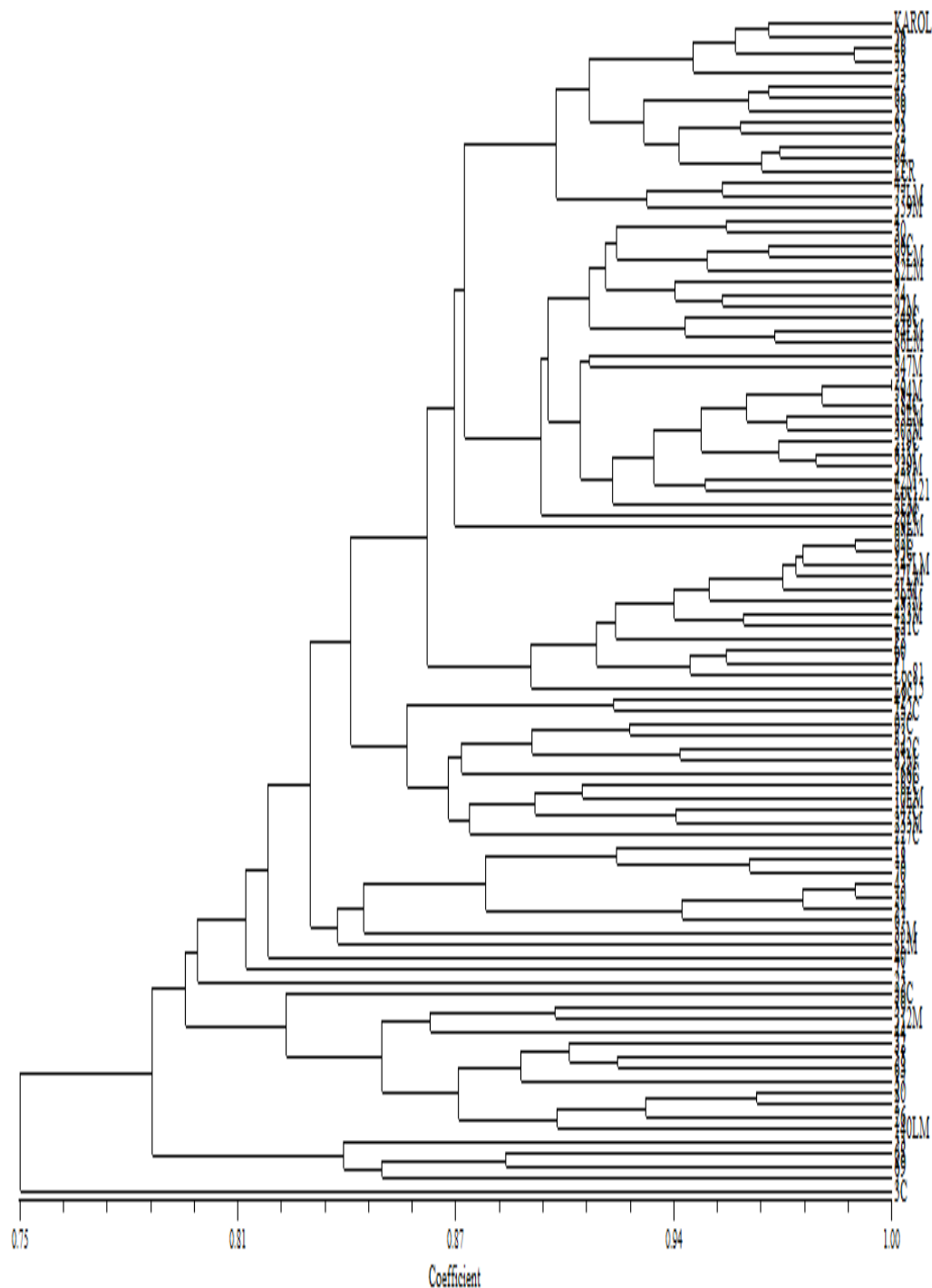


FIGURA 6. Similaridade do perfil metabólico de 98 estirpes de *Aeromonas* em relação a utilização de 95 fontes de carbono.

Dendrograma de similaridade calculado utilizando o coeficiente de Dice e agrupado pelo UPGMA.

O coeficiente de similaridade entre todas as estirpes é 0,75. No entanto é possível observar que a estirpe AC 3C de *A. caviae*, um isolado de fezes, é a que aparentemente apresenta perfil metabólico mais divergente em relação às *Aeromonas* analisadas.

Embora exista um elevado nível de similaridade na utilização das fontes de carbono analisadas entre as estirpes de *Aeromonas*, há variabilidade no perfil metabólico, o que poderia permitir a diferenciação ao nível de espécie.

Isto está de acordo com Abbott, Cheung e Janda (2003) que relatam uma elevada diversidade fenotípica entre as espécies do gênero *Aeromonas* e indicam que a fermentação de determinados carboidratos pode auxiliar na identificação de algumas espécies.

A identificação dos testes que apresentaram maior variabilidade entre as espécies de *Aeromonas* foi determinada pela análise de PCA utilizando o programa *Matlab*. Apenas os substratos apresentados na Tabela 4 foram considerados nesta análise e as estirpes identificadas apenas ao nível de gênero foram excluídas.

Os resultados obtidos indicam que entre as 60 fontes de carbono cujo resultado foi variável entre as estirpes, L-arabinose, D-celobiose, gentiobiose, lactulose, D-lactose, metilpiruvato, mono-metil-succinato, ácido D-galacturônico, ácido D,L-lático, L-histidina, L-ornitina, L-treonina, ácido urocânico, ácido γ -aminobutírico, D-manose, ácido cítrico, ácido cis-aconítico, glucose 6-fosfato, glucose 1-fosfato, putrescina, L-prolina, ácido propiônico, turanose e N-acetil-D-galactosamina são os que mostram maior potencial para a separação das espécies.

Para 50 estirpes de *Aeromonas* analisadas em relação à fermentação de carboidratos incomuns, Abbott, Cheung e Janda (2003) relataram que a utilização da gentiobiose foi negativa para as estirpes analisadas, o que difere dos resultados encontrados neste trabalho. Informaram também que lactulose, ácido urocânico, manose, glucose-1-fosfato e glucose-6-fosfato apresentavam resultados potencialmente discriminatórios entre *A. caviae*, *A. media* e *A. eucrenophila*, as duas últimas espécies não representadas na amostra analisada neste estudo e L-arabinose para distinguir *A. hydrophila* e *A. caviae* de *A. veronii* bv sobria e *A. trota*. O ácido urocânico, celobiose e lactose, para diferenciar entre os membros do complexo *A. hydrophila* que inclui *A. bestiarum* e *A. salmonicida*, não incluídas na amostra aqui analisada. A celobiose para diferenciar *A. hydrophila*, *A. trota*, *A. veronii* de *A. caviae*, mas foram encontradas diferenças nos resultados desse estudo e os resultados aqui obtidos.

Com base nos resultados de PCA foi possível verificar o agrupamento das estirpes de acordo com a espécie, como indicado na Figura 7.

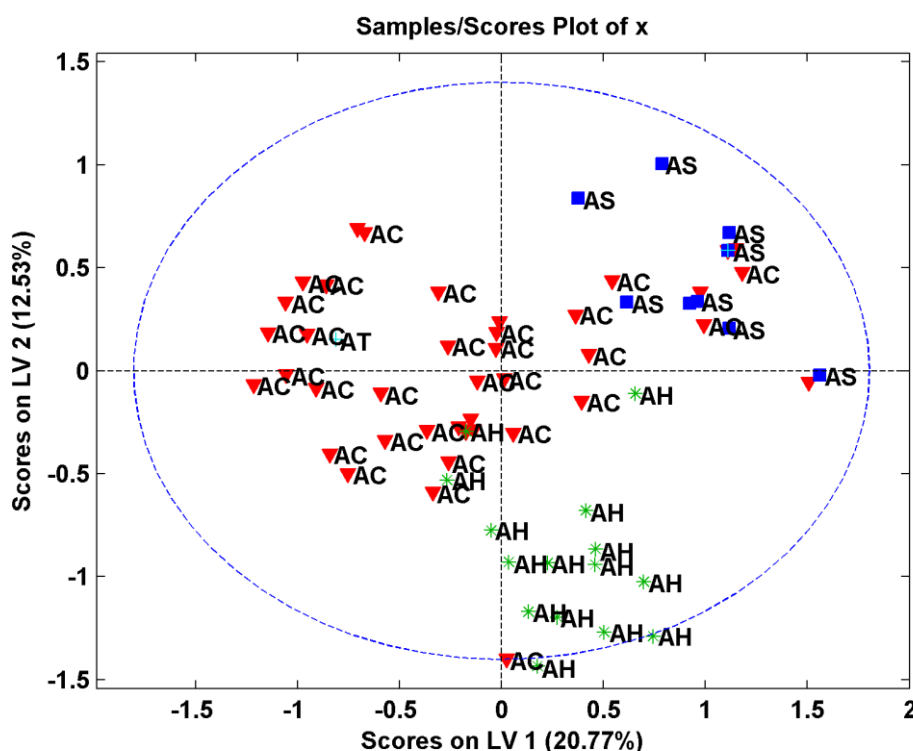


FIGURA 7. Distribuição das espécies de *Aeromonas* considerando os substratos selecionados na análise de PCA.

▼ *A. caviae* * *A. hydrophila* ■ *A. veronii* bv sobria ★ *A. trota*
Os scores foram calculados utilizando o programa PLS-Toolbox 6.5, operando em ambiente Matlab 7.13.

No entanto, observa-se que não há uma separação absoluta uma vez que algumas estirpes de *A. caviae* estão representadas entre as de *A. hydrophila* e *A. veronii* bv sobria e *A. hydrophila* entre *A. caviae*; não houve separação de *A. trota*. Em relação a esses achados é relevante confirmar a identificação das estirpes cujo comportamento foi diferente do esperado utilizando métodos moleculares, como o sequenciamento do gene *gyrB* que permite uma boa discriminação para as espécies de *Aeromonas* (YÁÑEZ et al., 2003) e também aumentar o número da amostra, com ênfase em *A. hydrophila*, *A. veronii* bv sobria e *A. trota*.

A maioria das estirpes utilizadas neste estudo foi isolada a partir de fezes de pacientes com diarreia (VIZZOTTO, 2009; SUREK et al., 2010; PREDIGER et al., 2012; ASSIS e tal., 2014). As bactérias patogênicas apresentam diversos atributos que lhes permitem romper barreiras de defesa do hospedeiro, escapar do sistema imune inato ou até mesmo obter o controle sobre funções fisiológicas de mucosas. A infecção

envolve a proliferação eficiente no hospedeiro e a disseminação entre novos hospedeiros. Para tanto os patógenos são equipados com atributos básicos indispensáveis de patogenicidade e de adaptação, incluindo fatores metabólicos que permitem a colonização dos nichos infectados do hospedeiro (FUCHS et al., 2012).

Para uma espécie colonizar o intestino deve ser capaz de competir com a microbiota residente e utilizar os nutrientes disponíveis (FABICH et al., 2008). O epitélio intestinal é recoberto por uma camada de muco que tem uma função de barreira protetora, considerada a primeira linha de defesa entre as bactérias no lúmen e as células intestinais. O muco intestinal é um agregado altamente hidratado que contém como principal componente estrutural as mucinas. Estas são glicoproteínas que consistem de cadeias oligossacarídicas lineares ou ramificadas ligadas a uma proteína central que contém uma composição bem distinta de aminoácidos (DERRIEN et al., 2010; KIM e KHAN, 2013), sendo serina e treonina prevalentes, representando cerca de 40% da molécula nos humanos. Estes aminoácidos contêm cadeias laterais com grupamentos hidroxil que estão envolvidos na ligação de cadeias oligossacarídicas à proteína, que contém também uma alta porcentagem de prolina, ácido aspártico e ácido glutâmico. As cadeias laterais de oligossacarídeos são constituídas por fucose, galactose, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina e ácido siálico (PODOLSKI e ISSELBACHER, 1983; KIM e KHAN, 2013), manose e glucose (PODOLSKI e ISSELBACHER, 1983).

Além de prover sítios de ligação para bactérias, a mucina pode ser um fator importante para a colonização bacteriana fornecendo uma fonte de energia. A mucina é uma fonte de carbono importante para as bactérias, principalmente no clon onde a disponibilidade de carboidratos é limitada. Os carboidratos constituem cerca de 80% da mucina e constituem uma fonte endógena significativa de carbono e energia para os micróbios intestinais (DERRIEN et al., 2010).

Os resultados obtidos da análise das microplacas Biolog indicam que 100% das estirpes de *Aeromonas* em estudo utilizam L-serina, ácido aspártico, ácido glutâmico, galactose, N-acetilglucosamina e glucose, que são componentes da mucina. Além disso, exceto pela fucose, outros substratos que compõem o muco intestinal e estão representados na microplaca GN2, D-serina, N-acetil-D-galactosamina, D-manose, L-prolina e L-treonina também podem ser utilizados por uma parcela significativa das estirpes (Tabela 4).

Estudos com *E. coli* EDL 933 e MG1655 mostraram que a bactéria é capaz de utilizar os seguintes carboidratos presentes no muco intestinal e que fazem parte da microplaca Biolog GN2, fucose, galactose, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina *in vitro* e *in vivo*. Indicam também que a *E. coli* EDL 933, estirpe enteropatogênica, utiliza carboidratos que não são utilizados pela estirpe comensal MG1655 e sugerem uma estratégia pela qual patógenos utilizam propriedades metabólicas para se estabelecer no hospedeiro (FABICH et al., 2008).

Considerando as informações acima (FABICH et al., 2008), embora os resultados para *Aeromonas* tenham sido obtidos *in vitro* estes achados podem ser úteis para ajudar a compreender como *Aeromonas* sobrevive no intestino, uma vez que a habilidade de utilizar nutrientes disponíveis no hospedeiro é fundamental para o patógeno se estabelecer e causar infecção (FUCHS et al., 2012), e o metabolismo de carbono e energia é considerado essencial durante o estágio inicial de muitas infecções bacterianas (FRETER, 1992, citado por FABICH et al., 2008).

5.2 SEQUENCIAMENTO GENÔMICO

A estirpe *A. veronii* bv sobria 312M foi selecionada para o sequenciamento genômico, uma vez que esta é uma das espécies de *Aeromonas* menos estudadas, havendo até o momento apenas um genoma sequenciado de *A. veronii* B565, um isolado ambiental (LI et al., 2011). Além disso, esta estirpe foi previamente estudada quanto a presença de genes de virulência e verificou-se que a mesma apresenta os genes *ascFG*, parte do sistema de secreção tipo III, o gene *act*, que codifica a enterotoxina citotóxica, elastase e hemolisina *aerA*. Apresentou também efeitos citotóxico em células HRT 19 e atividade hemolítica contra eritrócitos humanos (WOLF, 2012). O sequenciamento do genoma da estirpe *A. veronii* bv sobria 312M resultou em 96.886 *reads* com tamanho médio de 438 pb, totalizando 43.503.790 pb. As sequências foram montadas utilizando o GS *de novo* Assembler v.2.7 (Roche). O tamanho estimado do genoma foi de 4.542.358 pb alocados em 526 *contigs* o maior com 116270 pb e o menor com 101pb, e tamanho médio de 8497 pb. A cobertura foi de aproximadamente 10 X. O número de bases com qualidade $\geq Q40$ foi 4.434.589 (97,6%). O conteúdo de C+G foi de 58,7%. Estes resultados são similares aos descritos para a estirpe de *A. veronii* B565, isolada de água, na China, e que contém um cromossomo circular de 4.551.783 pb e conteúdo de GC de 58.72% (LI et al., 2011).

A anotação automática do genoma da estirpe 312M foi realizada utilizando o RAST Server livremente disponível em <http://rast.nmpdr.org/>. O processo de anotação consiste em assinalar uma função e adicionar comentários sobre uma determinada sequência de nucleotídeos. O RAST utiliza subsistemas, definidos como um conjunto de proteínas que desempenham funções relacionadas, considerando grupos de proteínas que realizam uma função específica em cada via metabólica, para fazer a anotação. Isto permite uma comparação entre sistemas similares entre muitos genomas e permite detectar variações nos diferentes microrganismos, levando a uma anotação rápida e acurada (AZIZ et al., 2008). Foram identificadas 4.104 sequências codificadoras (CDS) e 115 RNAs ribossômicos e transportadores. Esses valores também são similares aos 4.057 genes codificadores de proteínas e 112 RNAs encontrados em *A. veronii* B565 (LI et al., 2011).

Os genes anotados de *A. veronii* bv sobria 312M foram alocados em diferentes subsistemas como indicado na Tabela 5.

TABELA 5. Genes anotados pelo RAST em subsistemas

Subsistema	Número de genes
Cofatores, vitaminas, grupos prostéticos, pigmentos	285
Parede celular e cápsula	172
Virulência, doença e defesa	96
Metabolismo de potássio	36
Fagos, profagos, elementos transponíveis, plasmídeos	20
Transporte de membrana	197
Aquisição e metabolismo de ferro	52
Metabolismo de RNA	213
Nucleosídeos e nucleotídeos	119
Metabolismo de proteínas	313
Divisão celular e ciclo celular	41
Motilidade e quimiotaxia	179
Regulação e sinalização celular	91
Metabolismo secundário	4
Metabolismo de DNA	108

Continua

Subsistema	Número de genes
Ácidos graxos, lipídeos e isoprenóides	118
Metabolismo de nitrogênio	42
Dormência e esporulação	2
Respiração	164
Resposta ao estresse	160
Metabolismo de compostos aromáticos	11
Aminoácidos e derivados	489
Metabolismo de enxofre	34
Metabolismo de fósforo	42
Carboidratos	422

Verifica-se que a maioria dos genes anotados faz parte do metabolismo de aminoácidos, carboidratos, proteínas, cofatores, RNA e transporte de membrana, centrais à obtenção de nutrientes e energia.

Vários transportadores para carboidratos estão presentes no genoma de *A. veronii* bv sobria 312M, o que é consistente com a capacidade da bactéria utilizar diversos desses compostos. De acordo com os resultados do Biolog, a bactéria é capaz de crescer utilizando monossacarídeos como D-glucose, frutose, galactose, manose; dissacarídeos como maltose, sacarose e trealose, e polissacarídeos como dextrina e glicogênio. Enzimas associadas com a degradação dos polissacarídeos foram identificadas no genoma da bactéria.

Também de acordo com resultados acima, verificou-se que o genoma de *A. veronii* bv sobria 312M contém o conjunto completo de genes para a via glicolítica (via de Embden Meyerhof-Parnas, EMP) que é a principal via de catabolismo de glicose utilizada pelos micro-organismos.

A. veronii bv sobria 312M foi capaz de crescer utilizando os aminoácidos L-alanina, D-serina e L-serina, L-asparagina, ácido L-glutâmico e ácido L-aspártico como fontes de carbono. Para o aminoácido alanina a via metabólica no genoma está incompleta, o que pode decorrer do fato de ser este um *draft* de *contigs*.

A bactéria não foi capaz de crescer em L-alaninamida, D-alanina, histidina, hidroxil-L-prolina, L-leucina, L-ornitina, L-fenilalanina, L-prolina, L-ornitina, L-treonina, D,L-carnitina e putrescina. A análise do genoma sugere que as vias de

degradação da hidroxil-L-prolina, treonina, leucina, ornitina, lisina e arginina (as duas últimas não fazem parte do Biolog) estão incompletas, que pode decorrer do fato de ser um *draft* genoma.

Entre os ácidos orgânicos representados no Biolog, apenas ácido acético, ácido succínico e ácido bromo succínico foram utilizados pela *A. veronii* bv sobria 312M. De acordo com a anotação realizada pelo RAST, apenas 17 genes associados com o metabolismo de ácidos orgânicos foram identificados no *draft* genoma dessa bactéria.

Um dos substratos que pode ser útil para separação de espécies de *Aeromonas* é o ácido D-L-lático (tabela 4). Todas as estirpes de *A. veronii* bv sobria testadas oram incapazes de utilizar esse composto como fonte de carbono, o que também foi observado por Abbott, Cheung e Janda (2003). Embora se trate de um *draft* genoma, neste não foram encontrados os genes que codificam para a lactato desidrogenase, lactato permease e respectivo regulador.

Em relação a achados relacionados à virulência, foram identificados genes que codificam para os Sistemas de Secreção Tipo III (T3SS) e VI (T6SS), além de hemolisinas, lipase, adesinas e genes associados com síntese de cápsula.

A presença de T3SS é comum em patógenos Gram-negativos como *E. coli* Enteropatogênica, *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri*, *Yersinia* spp. e *Pseudomonas aeruginosa* e desempenha um papel essencial na patogenicidade. O T3SS é capaz de translocar proteínas da célula bacteriana diretamente ao citoplasma da célula hospedeira, em um único passo, através de um complexo aparato denominado injetossoma, que atravessa as membranas interna e externa da célula bacteriana e a membrana citoplasmática da célula hospedeira. A transferência de proteínas efetoras permite à bactéria alterar processos fisiológicos da célula hospedeira facilitando a persistência e replicação do organismo no hospedeiro. O transporte é dependente de ATP e chaperonas (COBURN, SEKIROV e FINLAY, 2007).

A primeira sequência completa de T3SS em *Aeromonas* foi realizada em *A. hydrophila* AH-3. A sequência de DNA que codifica o T3SS compreende 35 genes presentes numa região de aproximadamente 30 kb do cromossoma e organizados em uma disposição similar aos de *P. aeruginosa*. Sistemas de secreção tipo III também foram identificados em *Aeromonas*, isoladas tanto de amostras clínicas como ambientais (VILCHES et al., 2008; PARKER e SHAW, 2011; LI et al., 2011). Entre as espécies de *Aeromonas* o T3SS é mais frequente em *A. veronii* e *A. hydrophila* (80% das estirpes) que em *A. caviae* (13%) (CHACÓN et al., 2004; VILCHES et al., 2008). Estudos com

mutantes mostraram que o T3SS é um importante fator relacionado à patogenicidade de *A. hydrophila* AH-3, uma vez que estudos envolvendo dose letal 50% realizados com a estirpes selvagem e mutante, em truta e camundongo, indicaram que o mutante apresentou virulência significativamente reduzida em relação ao selvagem. Em ensaios com linhagens de células eucarióticas o mutante também apresentou efeitos citotóxicos claramente reduzidos em relação ao selvagem (VILCHES et al., 2004). Em *A. veronii* bv sobria verificou-se a presença 35 genes (AscU, AscT, AscS, AscR, AscQ, AscP, AscO, AscN, AopN, Acr1, Acr2, AscX, AscY, AscV, AcrR, AcrG, AcrV, AcrH, AopB, AopD, ExsC, AxsB, AxsA, AxSD, AscB, AscC, AscD, AscE, AscF, AscG, AscH, AscI, AscJ, AscK, AscL) que codificam proteínas que compõe o T3SS, como descrito em *A. hydrophila* AH-3.

O sistema de secreção tipo VI (T6SS) também está envolvido na virulência de *Aeromonas*. Possui um mecanismo ainda pouco compreendido, no entanto, sabe-se que está envolvido na interação patógeno-hospedeiro, auxilia na adaptação ao ambiente e promove a infecção. O T6SS de *A. hydrophila* está envolvido na inibição da fagocitose e na citotoxicidade (SUAREZ et al., 2008 e 2010).

T6SS é codificado por 15 a 20 genes, que podem ser divididos em proteínas secretadas e proteínas não secretadas que podem ser componentes do aparato de secreção (SHA, KOZLOVA e CHOPRA et al., 2005; SUAREZ et al., 2008; SUAREZ et al., 2010). O T6SS é capaz de exportar proteínas efetoras para o meio extracelular ou é capaz de translocá-las diretamente no citoplasma da célula hospedeira eucariótica, semelhante ao que ocorre com o T3SS. O T6SS é formado por uma estrutura em forma de agulha, que é inserida na membrana da célula alvo e através da qual são liberadas proteínas efetoras (BÖNEMANN, PIETROSIUK e MOGK 2010; PARKER e SHAW, 2011).

Os primeiros genes funcionais do sistema de secreção tipo VI descritos em *Aeromonas*, foram isolados de *A. hydrophila*, e também mostraram que o T6SS é um sistema independente do sistema de secreção tipo III e do sistema flagelar (SUAREZ et al., 2008). Os genes do T6SS encontrados em *A. hydrophila* apresentaram alta identidade com *hcp*, e com as proteínas da família Vgr, *vasA*, *vasF*, *vasK* e *vasH* de *V. cholerae*. O gene *vasH* é um componente necessário para a expressão dos componentes deste sistema e *vasK* é uma proteína estrutural do T6SS (FILLOUX, HACHANI e BLEVES, 2008). Hcp e proteínas VgrG representam uma marca das proteínas secretadas pelo sistema de secreção tipo VI em todas as bactérias que possuem esse

sistema (SUAREZ et al., 2008 e 2010). Aparentemente este sistema de secreção não está presente em *A. veronii* B565 (LI et al., 2011; GRIM et al., 2014). Os achados da anotação do genoma parcial de *A. veronii* bv sobria revelam a presença de T6SS completo.

Genes codificando para hemolisina e lipase também foram identificados no genoma de *A. veronii* bv sobria. *Aeromonas* são capazes de produzir vários tipos de hemolisina que contribuem para a virulência destas bactérias através da produção de efeitos citotóxicos em eritrócitos e outras células eucarióticas (GALINDO et al., 2006). Em relação à lipase, a produção de enzimas extracelulares é importante para auxiliar na invasão e colonização do hospedeiro, e aquisição de nutrientes para a proliferação celular (ZHU et al., 2007). A presença de genes que codificam lipases e hemolisinas é comum entre *Aeromonas* (WOLF, 2012; GRIM et al., 2014).

A identificação de uma série de genes associados com adesão foi recentemente descrita em *Aeromonas* (GRIM et al. 2013, 2014). Estas estruturas, presentes na superfície bacteriana, desempenham um papel fundamental na colonização do hospedeiro, sendo essenciais para o desenvolvimento do processo infeccioso (SALYERS e WHITT, 2002). No genoma de *A. veronii* bv sobria 312M genes foram encontrados que codificam para as adesinas PapA e CFA/I.

A presença de genes associados com síntese de cápsula também foi detectada no genoma de *A. veronii* bv sobria 312M, e também foram descritos no genoma de *A. hydrophila* estirpes E1 e E2, *A. aquariorum* AAK1 e *A. veronii* B565 (GRIM et al., 2013). A expressão desses genes na estirpe 312M pode ser verificada através da realização de coloração capsular, como mostrado na Figura 8.

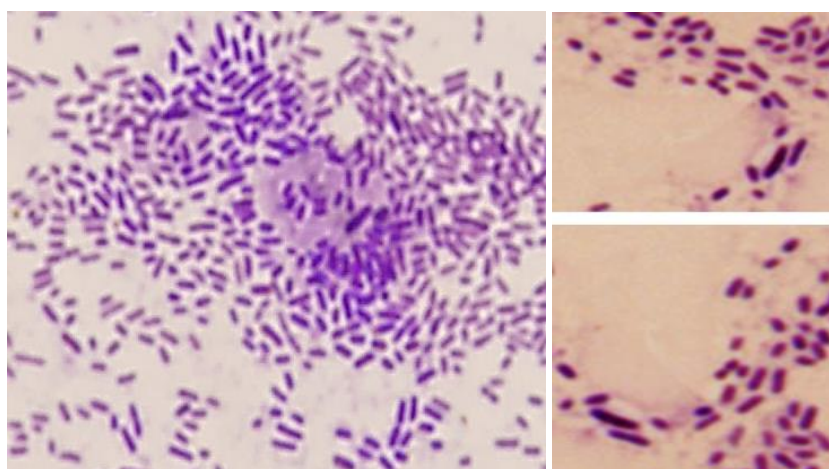


FIGURA 8. Cápsula em *A. veronii* bv sobria

A. veronii bv sobria cultivada em TSA. Coloração realizada de acordo com MURRAY e colaboradores (1994), utilizando cristal violeta 1% e solução de sulfato de cobre 20%.

Também foram identificados os genes que codificam a enzima Cloranfenicol-Acetil-Transferase associada com a resistência ao antimicrobiano cloranfenicol, e uma beta-lactamase classe D, associada com a resistência a antibióticos beta-lactâmicos.

As informações obtidas são relevantes para a compreensão dos mecanismos associados com a patogenicidade de *A. veronii* bv sobria 312M, e também para esclarecer os mecanismos de resistência aos antibióticos associados com *Aeromonas*, descritos no item 2.2.6.

5.3 INTERAÇÃO COM O SAL BILIAR DESOXICOLATO DE SÓDIO

A interação com o DOC foi avaliada através do cultivo na ausência e presença de DOC, e também através da análise do perfil proteômico.

5.3.1. Crescimento na presença de DOC

As bactérias entéricas apresentam mecanismos que permitem sua sobrevivência e proliferação no intestino humano, e é importante determinar quais são estes mecanismos. Foi verificado que a presença da bile é capaz de desencadear uma série de efeitos tóxicos sobre Gram-negativos tais como danos à membrana e ao DNA (MERRITT E DONALDSON, 2009).

A primeira abordagem para verificar um possível efeito do DOC sobre *Aeromonas* foi a cultivo, cujos resultados estão indicados na Tabela 6 e Figura 8.

TABELA 6. Crescimento de *A. veronii* bv sobria na ausência e presença de DOC

		Controle	DOC μM	24 DOC μM	240
Número de colônias (UFC/mL)					
	diluição	231±6	197±26	206±23	
	1×10 ²				
	diluição	938±40	929±53	907±24	
	1×10 ³				
Diâmetro das colônias (mm)		3	4	4	

Os resultados indicam que não houve diferença em relação ao número de colônias de *Aeromonas* que se desenvolveram sob as condições utilizadas (Tabela 4). Este resultado difere do observado por RIBEIRO et al. (2013) para o enteropatógeno *E. coli* M03 para o qual foi verificada redução na concentração de bactérias.

O resultado obtido (Tabela 4) sugere que a bactéria apresenta mecanismos de resistência à bile. Isso é reforçado pelo aumento observado no diâmetro das colônias crescidas na presença de DOC (Figura 8).

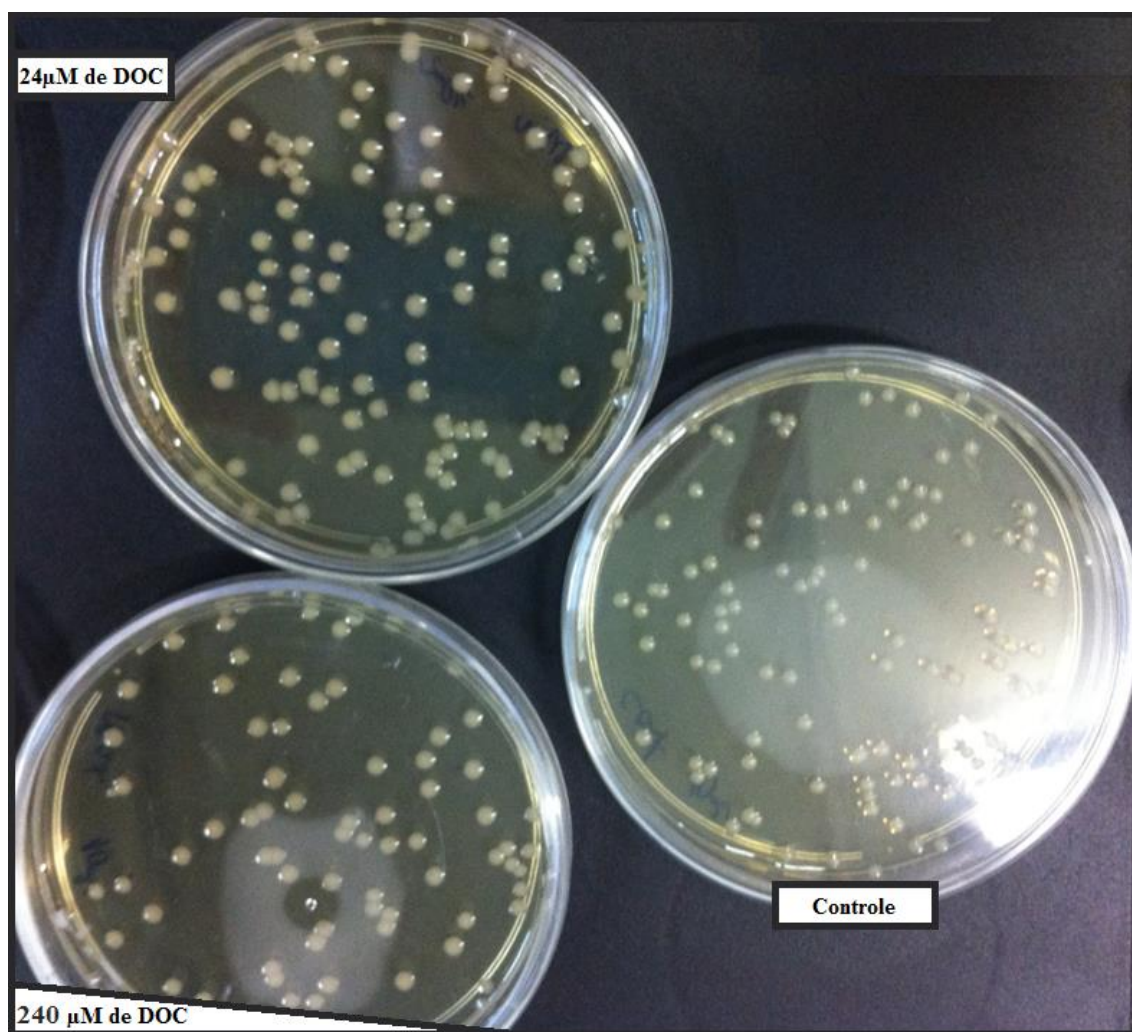


FIGURA 9. Crescimento de *A.veronii* bv sobria na ausência e presença de DOC. A bactéria foi cultivada em TSA, na ausência e nas concentrações de 24µM e 240 µM do sal biliar dexosicolato de sódio, a 36°C durante 16-18 horas.

Uma possibilidade para justificar esse efeito, seria a presença de cápsula mais proeminente nas células crescidas em DOC, uma vez que a produção desta estrutura já tinha sido verificada em *A.veronii* bv sobria 312M crescida na ausência do sal biliar (Figura 8). No entanto, utilizando a microscopia ótica não foi possível detectar nenhuma diferença em relação à cápsula nas bactérias crescidas nas condições de teste (resultados não mostrados).

5.3.2 Análise Proteômica

O sequenciamento do genoma representa um marco para a compreensão do mapa genético de qualquer organismo particular. No entanto, o entendimento genômico não possibilita uma compreensão completa acerca dos mecanismos fisiológicos ou patológicos dos organismos. Para que se compreenda o valor biológico completo do genoma sequenciado, torna-se necessária uma identificação precisa dos genes codificadores de proteínas em cada genoma, bem como a natureza dos produtos de proteínas funcionais. A sequência gênica corresponde a um repositório estático da informação genética, enquanto que estudos funcionais como a análise proteômica envolvem respostas celulares às mais diversas situações que são extremamente dinâmicas (ANSONG, PURVINE e ADKINS, 2008; HONDERMARCK et al., 2008).

A análise proteômica é uma ferramenta que complementa o sequenciamento do genoma, auxiliando na compreensão da expressão gênica, uma vez que analisa o produto final que é a proteína. Ela não se restringe apenas a simples listagem de proteínas, mas pode fornecer indícios substanciais quanto à organização e à dinâmica dos processos metabólicos, regulatórios e de sinalização através dos quais os micro-organismos desenvolvem-se nos diferentes ambientes e sob as mais variadas condições. Sendo assim, o conhecimento do proteoma pode ajudar na identificação de novos alvos farmacológicos, novas moléculas bioativas e marcadores biológicos para fins de diagnóstico clínico (MANN, HENDRICKSON e PANDEY, 2001; GRAHAM, ELLIOT e VAN EYK, 2005).

A proteômica representa uma importante ferramenta para integração entre as informações ao nível de proteína e o processo e melhoramento da anotação genômica (ANSONG, PURVINE e ADKINS, 2008). A análise proteômica associada ao *draft* genoma contribuirá para expandir o conhecimento sobre *A. veronii* bv sobria. Como não se conhece a resposta à bile de *Aeromonas*, a análise proteômica, através de eletroforese bi-dimensional, foi aplicada para o estudo da interação da bactéria com o sal biliar desoxicolato de sódio. Os extratos proteicos da bactéria crescida na ausência e em presença de DOC também foram analisados por SDS-PAGE.

5.3.3 Análise por SDS-PAGE

As técnicas de eletroforese em gel de acrilamida são amplamente utilizadas para a separação de proteínas de um extrato. A técnica de SDS-PAGE combina propriedades

desnaturantes do detergente dodecil sulfato de sódio (SDS) com o poder de separação de moléculas da eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), separa proteínas por massa e carga (SHAPIRO, VIÑUELA E MAIZEL JR, 1967).

Os resultados da análise dos extratos proteicos de *A. veronii* bv sobria 312M em SDS-PAGE estão mostrados na Figura 10.

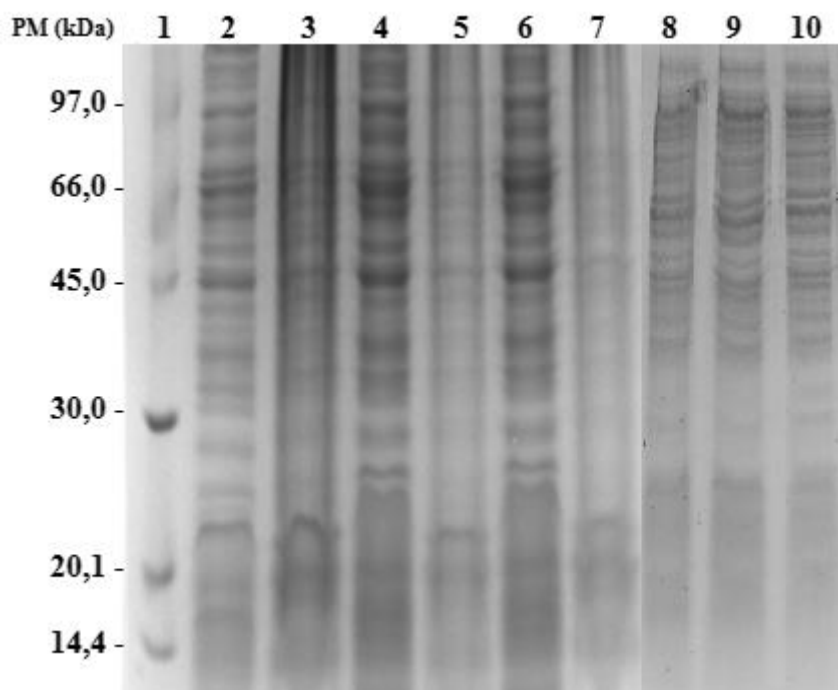


FIGURA 10. SDS-PAGE de extratos proteicos *A. veronii* bv sobria

Figura representativa de géis de SDS-PAGE. A bactéria foi cultivada na ausência e presença de desoxicolato de sódio e o sedimento tratado conforme indicado.

1. Marcador baixo peso molecular (GE Healthcare); 2. Extrato proteico obtido de cultura realizada em BHI - Controle (amostra sonicada); 3. Extrato proteico obtido de cultura realizada em BHI contendo 24 μ M de DOC (extrato precipitado com TCA); 4. Extrato proteico obtido de cultura realizada em BHI contendo 240 μ M de DOC (amostra sonicada); 5. Extrato proteico obtido de cultura realizada em BHI - Controle (extrato precipitado com TCA); 6. Extrato proteico obtido de cultura realizada em BHI contendo 24 μ M de DOC (amostra sonicada); 7. Extrato proteico obtido de cultura realizada em BHI contendo 240 μ M de DOC (extrato precipitado com TCA); 8. Extrato proteico obtido de cultura realizada em BHI - Controle (extração direta); 9. Extrato proteico obtido de cultura realizada em BHI contendo 24 μ M de DOC (extração direta); 10. Extrato proteico obtido de cultura realizada em BHI contendo 240 μ M de DOC (extração direta).

Pode-se observar que os extratos que foram precipitados com TCA não permitiram uma boa visualização das bandas proteicas. Os resultados da eletroforese SDS-PAGE das amostras sonicadas mostram a separação de bandas, no entanto o perfil apresentado é similar nas três condições analisadas. Ou seja, não foi detectada nenhuma banda diferencial nessas condições. Em relação ao extrato direto, no qual uma alíquota da cultura é retirada e fervida, também foi obtida uma boa separação das bandas, mas o

mesmo perfil foi observado em todas condições analisadas. Os extratos foram então analisados através de eletroforese bidimensional.

5.3.4 Eletroforese bidimensional

A eletroforese em gel de poliacrilamida tem sido extremamente útil para a separação e quantificação de espécies de proteínas a partir de misturas complexas de células, tecidos e outras amostras biológicas (O'FARRELLS, 1975).

Esta tecnologia possui diversas aplicações: separação de misturas complexas de proteínas em componentes individuais de polipeptídeo; na comparação de perfis de expressão de proteínas de amostras pares (normal versus células transformadas, células em diferentes estágios de crescimento, etc) e na escolha de uma condição de interesse, por exemplo, a adição de uma substância para dado tipo de célula, tecido ou organismo, permitindo que este revele o comportamento global das proteínas em resposta a estas condições, podendo analisar tanto qualitativa como quantitativamente em relação uns aos outros (CELIS e GROMOV, 1999).

Na primeira dimensão da eletroforese bidimensional realiza-se a focalização isoeletrica (IEF) e, na segunda dimensão, a eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Na focalização isoeletrica as proteínas são separadas de acordo com seu ponto isoeletrico em tiras de IPGs (*Immobilised pH Gradients*) que possuem, em uma das faces, um gradiente de pH imobilizado numa matriz de poliacrilamida. Após, as proteínas já distribuídas de acordo com seu ponto isoeletrico são separadas de acordo com suas massas moleculares, em gel desnaturante de poliacrilamida (GÖRG et al., 2007).

A seguir são mostrados géis 2D fotodocumentados representativos, de extratos proteicos de *A. veronii* bv sobria 312 cultivada em BHI e após choque em presença de DOC na concentração de 240µM (Figuras 11 e 12).

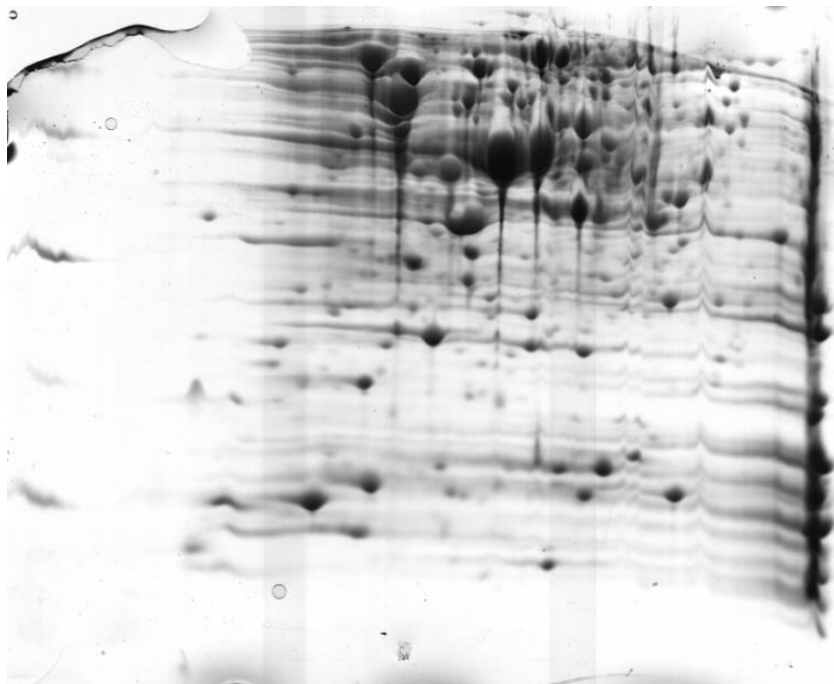


FIGURA 11. Gel bidimensional de extrato proteico de *A. veronii* bv sobria

A bactéria foi crescida em BHI e o extrato preparado conforme descrito no item 4.4.2.1.

A primeira dimensão foi realizada em tiras IPG 13 cm com faixa de pH 4 a 7 carregadas com 375µg de proteínas e a segunda dimensão em gel de poliacrilamida 11,6%. O gel foi corado com PhastGel Blue R 0,1%.

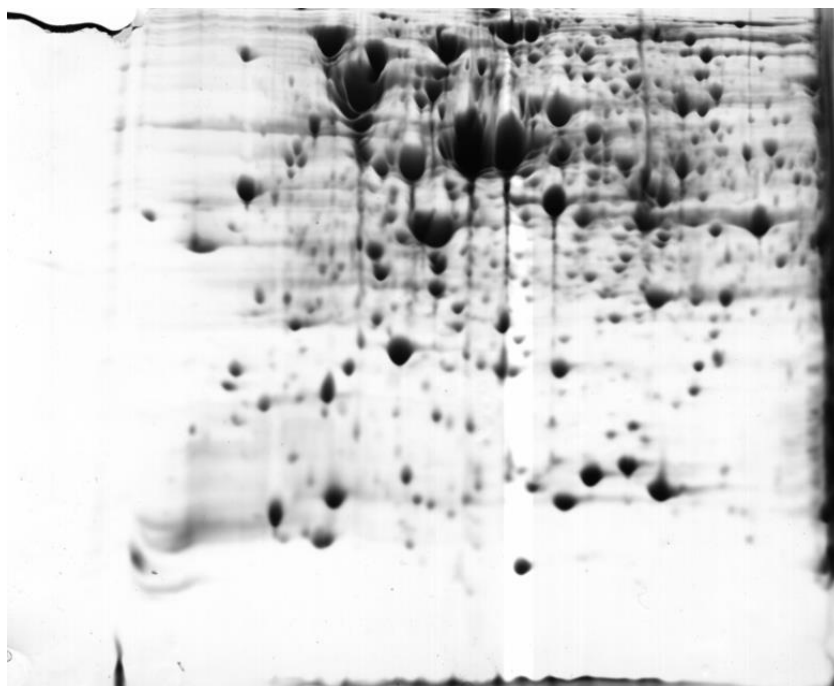


Figura 12. Gel bidimensional de extrato proteico de *A. veronii* bv sobria

A bactéria foi crescida em BHI e então submetida à choque com 240 µM do sal biliar desoxicolato de sódio, conforme descrito no item 4.4.2.1

A primeira dimensão foi realizada em tiras IPG 13 cm com faixa de pH 4 a 7 carregadas com 375µg de proteínas e a segunda dimensão em gel de poliacrilamida 11,6%. O gel foi corado com PhastGel Blue R 0,1%.

Foram realizados 3 ensaios independentes, em triplicata, e os géis foram analisados através do programa ImageMaster 6.0 para identificar a presença de *spots* diferencialmente expressos entre as condições de análise. Entretanto os resultados não revelaram bandas proteicas diferencialmente expressas em *A.veronii* bv sobria 312M após choque com DOC.

A análise proteômica baseada em géis 2D funciona muito bem para bactérias. As três principais vantagens desta técnica são a sua robustez, seu paralelismo e sua capacidade única de separar proteínas com alta resolução. No entanto, alguns problemas surgem quando as proteínas das quais se deseja avaliar a expressão não são abundantes, são pouco solúveis e/ou de membrana, gerando restrições na análise (RABILLOUD et al., 2010).

Embora popular, a análise proteômica baseada em gel 2D-PAGE tem muitas limitações. Trata-se de uma técnica trabalhosa, em que proteínas de baixa abundância são particularmente difíceis de detectar em misturas complexas de proteínas e contaminantes. Necessita-se realizar a escolha da faixa do gradiente de pH a ser usado na primeira dimensão, como também determinar o percentual de acrilamida a ser utilizado no gel da segunda dimensão que definirá quais proteínas serão bem separadas, o que sempre causará falha na detecção de certas proteínas (QUIRINO et al., 2010).

Estes fatores podem ter contribuído para a falha na detecção de proteínas diferencialmente expressas por *A. veronii* bv sobria em presença de DOC. Uma alternativa que poderia aumentar a sensibilidade da metodologia de eletroforese bidimensional é a utilização do DIGE.

DIGE é um sistema de marcação de proteínas que permite a separação quantitativa de duas ou mais amostras por detecção de fluorescência óptica de proteínas diferencialmente marcadas que são separadas eletroforeticamente no mesmo gel, eliminando as variações resultantes de diferenças de corrida dos géis independentes. Esta técnica apresenta uma sensibilidade maior quando comparada com a coloração de prata ou com *coomassie brilliant blue*, uma vez que é capaz de detectar uma quantidade muito pequena de proteínas (UNLU, MORGAN E MINDEN, 1997; ALBAN et al., 2003).

Outra possibilidade seria realizar a análise de transcriptoma para verificar os genes expressos na ausência e presença de DOC. Esta metodologia tem sido amplamente aplicada ao estudo do perfil de expressão gênica em bactérias (CROUCHER e THOMSON, 2010).

6 CONCLUSÕES

Aeromonas são capazes de utilizar uma variedade de fontes de carbono, e aparentemente os carboidratos são preferencialmente utilizados.

Um grupo de vinte e quatro substratos apresenta potencial para separação das espécies, mas não houve uma separação bem definida.

O sequenciamento de nucleotídeos do genoma de *A. veronii* bv sobria 312M resultou num *draft* genoma de aproximadamente 4,5 Mb, com teor de CG de 58,7%. Foram identificados genes relacionados com metabolismo, virulência e resistência a antibióticos.

O cultivo de *A. veronii* bv sobria 312M em presença do sal biliar desoxicolato de sódio causou aumento no tamanho do diâmetro das colônias em relação ao controle, mas não houve diferença em relação ao número de colônias, indicando que a bactéria apresenta mecanismos de resistência à bile.

Nas condições de ensaio não foi possível detectar proteínas diferencialmente expressas em presença do sal biliar desoxicolato de sódio utilizando eletroforese bidimensional.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, S.L.; CHEUNG, W.K.; KROSKE-BRYSTOM, S.; MALEKZADEH, T.; e JANDA, J.M. Identification of *Aeromonas* strains to the genospecies level in the clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 30, n. 5, p.1262-1266,1992.
- ABBOTT, S.L.; SELI, L.S.; CATINO JR, M.; HARTLEY, M.A. e JANDA, M. Misidentification of unusual *Aeromonas* species as members of the genus *Vibrio*: a continuing problem. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 36, n. 4, p. 1103-1104, 1998.
- ABBOTT, S.L.; CHEUNG, W.K.W. e JANDA, J.M. The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, n. 6, p. 2348-2357, 2003.
- ALBAN, A.; DAVID, S.O.; BJORKESTEN, L.; ANDERSSON, C.; SLOGE, E.; LEWIS, S. e CURRIE, I. A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. *Proteomics*, v. 3, n.1, p. 36-44, 2003.
- ALBARADO, L.; SAMPER, I. e GUZMÁN, M. *Aeromonas* spp. como agente causal de síndrome diarreico agudo en niños menores de 6 años de edad. *Kasmera*, v. 33, n. 1, 2005.
- ANSONG, C.; PURVINE, S. O.; ADKINS, J.N. et al. Proteogenomics: needs and roles to be filled by proteomics in genome annotation. *Briefings In Functional Genomics And Proteomics*, v. 7, p. 50-62, 2008.
- ASSIS, F. E. A.; WOLF, S.; SUREK, M.; De Toni, F.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; FARAH, S.M. S. S.; PICHETH, G. e FADEL-PICHETH, C.M.T. Impact of *Aeromonas* and diarrheagenic *Escherichia coli* screening in patients with diarrhea in Paraná, southern Brazil. *Journal of Infection in Developing Countries*, v.8, p.1609-1614, 2014.
- AZIZ, R.K.; BARTELS, D.; BEST, A.A.; DEJONGH, M.; DISZ, T.; EDWARDS, R.A.; FORMSMA, K.; GERDES, S.; GLASS, E.M.; KUBAL, M.; MEYER, F.; OLSEN, G.J.; OLSON, R.; OSTERMAN, A.L.; OVERBEEK, R.A.; MCNEIL, L.K.; PAARMANN, D.; PACZIAN, T.; PARRELLO, B.; PUSCH, G.D.; REICH, C.; STEVENS, R.; VASSIEVA, O.; VONSTEIN, V.; WILKE, A. e ZAGNITKO, O. The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics*, 9:75, 2008.
- BALSALOBRE, L.C. *Pesquisa de genes codificadores de enterotoxinas e β -lactamases em *Aeromonas jandaei* e *Aeromonas hydrophila* provenientes de ambientes aquáticos*. 2009. 166 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública, Universidade de São Paulo – São Paulo, 2009.
- BALZER, S; MALDE, K.; LANZÉN, A.; SHARMA, A. e JONASSEN, I. Characteristics of 454 pyrosequencing data - enabling realistic simulation with flowsim. *Bioinformatics*. v. 26, n. 18, p. i420-425, 2010.

BEGLEY, M.; GAHAM, C.G.M. e HILL, C. The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 29, p. 625–651, 2005.

BERNSTEIN, C.; BERNSTEIN, H.; PAYNE, C.M.; BEARD, S.E. e SCHNEIDER, J. Bile Salt Activation of Stress Response Promoters in *Escherichia coli*. *Current Microbiology*, v. 39, p. 68–72, 1999.

BÖNEMANN, G.; PIETROSIUK, A. e MOGK, A. Tubules and donuts: a type VI secretion story. *Molecular Microbiology*, v. 76, n. 4, p. 815–821, 2010.

BOUCHIER, I. A. D. Biliary tract disease. In: BOUCHIER, I. A. D., editor. *Gastroenterology*. 3ª ed., Baillière Tindall, London, p. 302–327, 1982.

CARVALHO, M.J.; MARTÍNEZ-MURCIA, A.; ESTEVES, A.C.; CORREIA, A. SAAVEDRA, M.J. Phylogenetic diversity, antibiotic resistance and virulence traits of *Aeromonas* spp. from untreated waters for human consumption. *International Journal of Food Microbiology*, v. 159, p. 230–239, 2012.

CELIS, J.E. e GROMOV, P. 2D protein electrophoresis: can it be perfected? *Current Opinion in Biotechnology*, v. 10, p. 16–21, 1999.

CHACÓN, M.R.; SOLER, L.; GROISMAN, E.A.; GUARRO, J.; FIGUERAS, J.M. Type III Secretion System Genes in Clinical *Aeromonas* Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, v.42, n.3, p.1285–1287, 2004.

CHENG, N.C ; HORNG, S.Y.; CHANG, S.C. e TANG, Y.B. Nosocomial infection of *Aeromonas hydrophila* presenting as necrotizing fasciitis. *Journal of the Formosan Medical*, v. 103, n. 1, p. 53–57, 2004

CHOPRA, A.K.; HOUSTON, C.W. Enterotoxins in *Aeromonas*-associated gastroenteritis. *Microbes and Infection*, v. 1, p. 1129–1137, 1999.

COBURN, B.; SEKIROV, I. e FINLAY, B.B. Type III Secretion Systems and Disease. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 20, n. 4, p. 535–549, 2007.

COLWELL, R.R.; MACDONELL, M.T. e DE LEY, J. Proposal to recognize the family *Aeromonadaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 36, p. 473–477, 1986.

CROUCHER, N. e THOMSON, N. Studying bacterial transcriptomes using RNA-seq. *Current Opinion in Microbiology*, v. 13, n. 5, 619–624, 2010.

DEMARTA, A.; KÜPFER, M.; RIEGEL, P.; HARF-MONTEIL, C.; TONOLLA, M.; PEDUZZI, R.; MONERA, A.; SAAVEDRA, M.J. e MURCIA, A.M. *Aeromonas tecta* sp. nov., isolated from clinical and environmental sources. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 31, p. 278–286, 2008.

DERRIEN, M.; VAN PASSEL, M.W.J; VAN DE BOVENKAMP, J..H.B.; SCHIPPER, R.; DE VOS, W. e DEKKER, J. Mucin-bacterial interactions in the human oral cavity and digestive tract. *Gut Microbes*, v. 1, n. 4, p. 254-268, 2010.

DICE, L. R. Measures of de amount of ecologic association between species. *Ecology*. v.26, p.297-302, 1945.

DWIVEDI, M.; MISHRA, A.; PRASAD, A.; AZIM, A.; SINGH, R.K.; BARONIA, A.K.; PRASAD, K.N. e DWIVEDI, U.N. *Aeromonas caviae* septicemia in immunocompetent gastrointestinal carriers. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 12, n. 6, p. 547-548, 2008.

ELAHI, E. e RONAGHI, M. Pyrosequencing: a tool for DNA sequencing analysis. *Methods in Molecular Biology*, v. 255, p. 211-219, 2004.

ESTELLER, A. Physiology of bile secretion. *World Journal of Gastroenterology*, v. 14, n. 37, p.5641–5649, 2008.

FABICH, A.J.; JONES, S.A.; CHOWDHURY, F.Z.; CERNOSEK, A.; ANDERSON, A.; SMALLEY, D.; MCHARGUE, J.W.; HIGHTOWER, G.A.; SMITH, J.T.; AUTIERI, S.M.; LEATHAM, M.P.; LINS, J.J.; ALLEN, R.L.; LAUX, D.C.; COHEN, P.S.; CONWAY, T. Comparison of carbon nutrition for pathogenic and commensal *Escherichia coli* strains in the mouse intestine. *Infection and Immunity*, v.76, v.3, p.1143-1152, 2008.

FARMER III, J.J; ARDUINO, M. J.; HICKMAN-BRENNER, S. W. The genera *Aeromonas* and *Plesiomonas*. *Prokaryotes: A handbook on the biology of bacteria*. ed.3, v.6, p.564-596, 2006.

FIGUEIRA, V.; VAZ-MOREIRA, I.; SILVA, M.; MANAIA, C.M. Diversity and antibiotic resistance of *Aeromonas* spp. in drinking and waste water treatment plants. *Water Research*, v. 45, p.5599–55611, 2011.

FILLOUX, A., HACHANI, A. e BLEVES, S. The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes. *Microbiology*, v. 154, n. 6, p. 1570-1583, 2008.

FUCHS, T.M.; EISENREICH, W.; HEESEMANN, J.; GOEBEL, W. Metabolic adaptation of human pathogenic and related nonpathogenic bacteria to extra- and intracellular habitats. *FEMS Microbiology Reviews*, v.36, p.435-462, 2012.

GALINDO, C.L.; SHA, J.; FADL, A.A.; PILLAI, L.L. e CHOPRA, A.K. Host immune responses to *Aeromonas* virulence factors. *Current Immunology Reviews*, v.2, n.1, p.13-26, 2006.

GHENGHESH, K.S.; AHMED, S.; EL-KHALEK, R.A.; AL-GENDY, A. e KLENA, J. *Aeromonas*-Associated Infections in Developing Countries. *Journal Infection in Developing Countries*, v. 2, n. 2, p. 81-98, 2008.

GÖRG, A.; KLAUS, A.; LÜCK, C.; WEILAND, F. e WEISS, W. Two-Dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients for proteome analysis. *A laboratory Manual*. Technische Universität München, 2007 (<http://www.wzw.tum.de/proteomik>).

GONZÁLEZ, M. J.; VILLANUEVA, M.P.; LATIF, F.; FERNÁNDEZ, F. e FERNÁNDEZ, H. Aislamiento de *Plesiomonas shigelloides* y *Aeromonas veronii* biótipo *sobria* en heces de lobo marino común sudamericano, *Otaria flavescens* (Shaw, 1800). *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, v. 44, n. 3, p. 763-765, 2009.

GRAHAM, D.R.; ELLIOTT, S.T. e VAN EYK, J.E. Broad-based proteomic strategies: a practical guide to proteomics and functional screening. *The Journal Physiology*, v. 563, p. 1-9, 2005.

GRIM, C.J.; KOZLOVA, E.V.; SHA, J.; FITTS, E.C.; VAN LIER, C.J.; KIRTLEY, M.L.; JOSEPH, S.J.; READ, T.D.; BURD, E.M.; TALL, B.D.; JOSEPH, S.W.; HORNEMAN, A.J.; CHOPRA, A.K.; SHAK, J.R. Characterization of *Aeromonas hydrophila* wound pathotypes by comparative genomic and functional analyses of virulence genes. *mBio* v.4, n2, e00064-13, 2013.

GRIM, C.J.; KOZLOVA, E.V.; PONNUSAMY, D.; FITTS, E.C.; SHA, J.; KIRTLEY, M.L.; VAN LIER, C.J.; TINNER, B.L.; EROVA, T.E.; JOSEPH, S.J.; READ, T.D.; SHAK, J.R.; JOSEPH, S.W.; SINGLETARY, E.; FELLAND, T.; BAZE, W.B.; HORNEMAN, A.J.; CHOPRA, A.K. Functional genomic characterization of virulence factors from necrotizing fasciitis-causing strains of *Aeromonas hydrophila*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.80, n14, p.4162-4183, 2014.

GUERRA, I.M.F.; FADANELLI, R.; FIGUEIRÓ, M.; SCHREINER, F.; DELAMARE, A.P.L.; WOLLHEIM, C.; COSTA, S.O.P. e ECHEVERRIGARAY, S. *Aeromonas* associated diarrhoeal disease in south Brazil: prevalence, virulence factors and antimicrobial resistance. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 38, p. 638-643, 2007.

GUNN, J. S.. Mechanisms of bacterial resistance and response to bile. *Microbes and Infection*, v. 2, n. 8, p. 907-913, 2000.

HOFER, E.; REIS, C.M.F.; THEOPHILO, G.N.D.; CAVALCANTI, V.O.; LIMA, N.V. e HENRIQUES, M.F.C.M. Envolvimento de *Aeromonas* em surto de doença diarreica aguda em São Bento do Una, Pernambuco. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 39, n. 2, p. 217-220, 2006.

HOLMES, B.; COSTAS, M.; GANNER, M.; ON, S.L. e STEVENS, M. Evaluation of Biolog system for identification of some gram-negative bacteria of clinical importance. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 32, n. 8, 1970-1975, 1994.

HONDERMARCK, H.; TASTET, C.; YAZIDI-BELKOURA, I.E.; TOILLON, R.A e BOURHIS, X.L. Proteomics of Breast Cancer: The Quest for Markers and Therapeutic Targets. *Journal of Proteome Research*, v. 7, n. 4, p. 1403-1411, 2008.

HORNEMAN, A. J. e ALI, A. *Aeromonas*. In *Manual of Clinical Microbiology*, pp. 658-665. Editores J. Versalovic, K.C. Carroll, G. Funke, J. H. Jorgensen, M. L. Landry & D. W. Warnock. Washington, DC. ASM Press, 2011.

IGBINOSA, I.H.; IGUMBOR, E.U.; AGHDASI, F.; TOM, M. e OKOH, A.I. Emerging *Aeromonas* species infections and their significance in public health. *The ScientificWorld Journal*, v. 2012, p1-13, 2013.

ISONHOOD, J. e DRAKE, M. *Aeromonas* species in foods. *Journal of Food Protection*, v. 65, n. 3, p. 575-582, 2002.

JANDA, J.M. e ABBOTT, S. The Genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 23, n.1, p. 35-73, 2010.

JESUS, M.C.; URBAN, A.A.; MARASIGAN, M.E.; FOSTER, D.E.B. Acid and bile-salt stress of Enteropathogenic *Escherichia coli* enhances adhesion to epithelial cells and alters glycolipid receptor binding specificity. *The Journal of Infectious Diseases*, v.192, p.1430-1440, 2005.

KHAJANCHI, B.K.; FADL, A.A.; BORCHARDT, M.A., BERG, R.L., HORNEMAN, A.J.; STEMPER, M.E.; JOSEPH, S.W.; MOYER, N.P.; SHA, J.; CHOPRA, A.K.; Distribution of virulence factors and molecular fingerprinting of *Aeromonas* species isolates from water and clinical samples: suggestive evidence of water-to-human transmission. *Applied and Environmental Microbiology*, v.76, p. 2313–2325, 2010.

KAMANO, Y.; OHASHI, H.; KIKUCHI, T.; WATANABE, K. e KITAHARA, M. Liver abscess and *Aeromonas* bacteremia with septic pulmonary embolism. *Internal Medicine*, v. 42, n. 10, p. 1047-1049, 2003.

KIM, J.J. e KHAN, W.I. Goblet Cells and Mucins: Role in Innate Defense in Enteric Infections. *Pathogens*, v. 2, p. 55-70, 2013.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C. e WINN JR, W.C. *Diagnóstico Microbiológico*. 5. ed. Editora Médica e Científica Ltda: Rio de Janeiro, 2001.

LI, Y.; LIU, Y.; ZHOU, Z.; HUZHANG, HUANG, H.; REN, Y.; ZHANG, Y.; LI, G.; ZHOU, Z. e WANG, L. Complete Genome Sequence of *Aeromonas veronii* Strain B565. *Journal of Bacteriology*, v. 193, n. 13, p. 3389–3390, 2011.

LONGA, A.; VIZCAYA, L.; NIEVES, B.; BRAVO, L.; MORIER, L.; PÉREZ-SCHAEEL, I. e CABRERA, L.E. Factores de virulencia asociados a la enteropatogenicidad en cepas de *Aeromonas* spp. aisladas de niños con diarrea en Mérida, Venezuela. *Revista Cubana Medicina Tropical*, v. 57, n. 2, p. 85-91, 2005.

MANN, M., HENDRICKSON, R. C., PANDEY, A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annual Review Biochemistry*. v. 70, p. 437-473, 2001.

MARGULIES, M. et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, v. 437, n. 7057, p. 376-80, 2005.

MARTIN-CARNAHAN, M.; JOSEPH, S. W. Family I. Aeromonadaceae. Order XII. Aeromonadales ord. nov. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, p. 556-578. Edited by G. M. Garrity. New York: Springer, 2005.

MARTINO, M.E.; FASOLATO, L.; MONTEMURRO, F.; ROSTEGHIN, M.; MANFRIN, A.; PATARNELLO, T.; NOVELLI, E. e CARDOZZO, B. Determination of microbial diversity of *Aeromonas* strains on the basis of multilocus sequence typing, phenotypic, and presence of putative virulence genes. *Applied and Environmental Microbiology*, v.77, n. 14, p. 4986–5000, 2011.

MAVROMATIS, K.; LAND, M.L.; BRETTIN, T. S.; QUEST, D.J.; COPELAND, A.; CLUM, A.; GOODWIN, L.; WOYKE, T.; LAPIDUS, A.; KLENK, H.P.; COTTINGHAM, R.W. e KYRPIDES, N.C. The fast changing landscape of sequencing technologies and their impact on microbial genome assemblies and annotation. *PLoS One*, v. 7, n. 12, p. e48837, 2012.

METZKER, M.L. Sequencing technologies - the next generation. *Nature Reviews Genetics*, v. 11, n. 1, p. 31-46, 2010.

MURRAY, R.G.E; WOOD, W.A. e KRIEG, N.R. *Methods for general and molecular bacteriology*. American Society for Microbiology Press:Washington D.C., 1994.

NELSON, D.L. e COX, M.M. *Lehninger princípios de bioquímica*. 3ed. Editora Camara Brasileira do Livro: São Paulo, 2002.

NOJIMOTO, I.T.I.; BEZANA, C.S.C.; DO CARMO, C.; VALADÃO, L.M. e CARRIJO, K.M. Prevalência de *Aeromonas* spp. em fezes diarreicas de crianças menores de 5 anos de idade na cidade de Goiânia, Goiás, no biênio 1995-1997. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.5, n.30, p.385-388, 1997.

O'FARRELLS, P.H. High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, v.250, p.4007-4021, 1975.

OVERBEEK, R.; OLSON, R.; PUSCH, G.D.; OLSEN, G.J.; DAVIS, J.J.; DISZ, T.; EDWARDS, R.A.; GERDES, S.; PARRELLO, B.; SHUKLA, M.; VONSTEIN, V.; WATTAM, A.R.; XIA, F. e STEVENS, R. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Research*, v.42, D206-214, 2014.

PALUMBO, S.; ABEYTA, C.; STELMA, G. e WESLEY, I.W. *Aeromonas, Arcobacter, and Plesiomonas. Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4^a ed. Washington: American Public Health Association – APHA, 2001. 676p. cap 30, p.283-290.

PARKER, J.L.; SHAW, J.G. *Aeromonas* spp. Clinical microbiology and disease. *Journal of Infection*, v.62, p.109-118, 2011.

PEMBERTON, J.M.; KIDD, S.P. e SCHIMIDT, R. Secret enzymes of *Aeromonas*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 152, n. 1, p. 1-10, 1997.

PEREIRA, C.S.; AMORIM, S.D.; SANTOS, A.F.M.; REIS, C.M.F.; THEOPHILO, G.N.D. e RODRIGUES, D.P. Caracterização de *Aeromonas* spp isoladas de neonatos hospitalizados. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 41, n. 2, p. 179-182, 2008.

PODOLSKI, D.K. e ISSELBACHER, K.J. Composition of Human Colonic Mucin. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 73, p. 142-153, 1983.

PREDIGER, K.C.; PEREIRA, R.S. WINCKLER, C.H.D.P.; SANTOS, R.C.V.; FADEL-PICHETH, C.M.T.; VIZZOTTO, B.S. Prospective study on *Aeromonas* outpatient with diarrhea in the central region of Rio Grande do Sul State. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 43, n. 3, p. 966-68, 2012.

PROUTY, A.M.; BRODSKY, E.; FALKOW, S. e GUNN, J.S. Bile-salt-mediated induction of antimicrobial and bile resistance in *Salmonella typhimurium*. *Microbiology*, v.150, p. 775–783, 2004.

PUTHUCHEARY, S. D.; PUAH, S. M. e CHUA, K.H. Molecular characterization of clinical isolates of *Aeromonas* species from Malaysia. *PLoS One*, v. 7, n. 2, p. 1-7, 2012.

QUIRINO, B.F.; CANDIDO, E.S.; CAMPOS, P.F.; FRANCO, O.L. e KRÜGER R.H. Proteomic approaches to study plant–pathogen interactions. *Phytochemistry*, v.71, p. 351–362, 2010.

RABILLOUD T.; CHEVALLET, M.; LUCH, S. e LELONG, C. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, presente and future. *Journal of Proteomics*, v. 73, p. 2064-2077, 2010.

RIBEIRO, C.B.A.; SOBRAL, M.G.; TANAKA, C.L.; DALLAGASSA, C.B.; PICHETH, G.; REGO, F.G.M.; ALBERTON, D.; HUERGO, L.F.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M. e FADEL-PICHETH, C.M.T. Proteins differentially expressed by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strain M03 due to the biliar salt sodium deoxycholate. *Genetics and Molecular Research*, v. 12, n.4, 4909-4917, 2013.

SAAVEDRA, M.J.; FIGUERAS, M.J. e MARTÍNEZ-MURCIA, A.J. Updated phylogeny of the genus *Aeromonas*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.56, p. 2481-2487, 2006.

SALYERS, A.A. e WHITT, D.D. *Bacterial Pathogenesis*. American Society for Microbiology Press: Washington D.C., 2ed, 2002.

SHA, J.; KOZLOVA, E.V. e CHOPRA, A.K. Role of various enterotoxins in *Aeromonas hydrophila*-induced gastroenteritis: generation of enterotoxin genedeficient mutants and evaluation of their enterotoxic activity. *Infection and Immunity*, v.70, n.4, p.1924-1935, 2002.

SHAPIRO, A.L.; VIÑUELA, E. e MAIZEL JR, J.V. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 28, n. 5, p. 815–820, 1967.

SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. *Numeral Taxonomy*. San Francisco: Freeman, p.573, 1973.

- STANO, F.; BRINDICCI, G.; MONNO, R.; RIZZO, C.; GHEZZANHI, F.; CARBONARA, S.; GUAGLIANONE, E.; DONELLI, G. e MONNO, L. *Aeromonas sobria* sepsis complicated by rhabdomyolysis in an HIV-positive patient: case report and evaluation of traits associated with bacterial virulence. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 667, 2008.
- SUAREZ, G.; SIERRA, J.C.; SHA, J.; WANG, S.; EROVA, T.E.; FADL, A.A.; FOLTZ, S.M.; HORNEMAN, A.J. e CHOPRA, A.A. Molecular Characterization of a Functional Type VI Secretion System from a Clinical Isolate of *Aeromonas hydrophila*. *Microbial Pathogenesis*, v.44, n.4, p.344-361, 2008.
- SUAREZ, G.; SIERRA, J.C.; EROVA, T.E.; SHA, J.; HORNEMAN, A.J. e CHOPRA, A.K. A Type VI Secretion System Effector Protein, VgrG1, from *Aeromonas hydrophila* That Induces Host Cell Toxicity by ADP Ribosylation of Actin. *Journal of Bacteriology*, v. 192, n. 1, p. 155–168, 2010.
- SUREK. M.; VIZZOTTO, B.S.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O.; DALLAGASSA, C.B.; FARAH, S.M.S.S. e FADEL-PICHETH. Identification and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas* spp. isolated from stool samples of Brazilian subjects with diarrhoea and healthy controls. *Journal of Medical Microbiology*, v. 59 p.373-374, 2010.
- SUREK, M. *Aspectos da adesão de Aeromonas a linhagens celulares imortalizadas*. 2014. 99p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná – Curitiba, 2014.
- THAICHINDA, S. e KOSITPANTAWON, N. Necrotizing Skin and Soft-Tissue Infections Associated with Septicemia: 7 Cases Report and Review. *Journal of the Medical Association of Thailand*, v. 91, n. 1, p. 117-23, 2008.
- TENA, D.; GONZÁLEZ-PRAETOURIUS, A.; GIMENO, C.; PÉREZ-POMATA, M.T. e BISQUERT, J. Infección extraintestinal por *Aeromonas* spp.: revisión de 38 casos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, v. 25, n. 4, p.:235-241, 2007.
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY.
Aeromonas: Human health criteria document, Office of Science and Technology, United States Protection Agency, Washington, DC, USA, 2006.
- ÜNLÜ, M.; MORGAN, M.E. e MINDEN, J.S. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis*, v. 18, n. 11, p. 2071-2077, 1997.
- VAN FAASSEN, A.; HAZEN, M.J.; VAN DEN BRANDT, P.A.; VAN DEN BOGAARD, A.E.; HERMUS, R.J.J. e JANKNEGHT, R.A. Bile acids and pH values in total feces and in fecal water from habitually omnivorous and vegetarian subjects. *The American Journal Clinical Nutrition*, v.58, n. 6, p. 917–922.

VILA, J.; RUIZ, J.; GALLARDO, J.; VARGAS, M.; SOLER, L.; FIGUERAS, M.J. e GASCÓN, J. *Aeromonas* spp. and traveler's diarrhea: clinical features and antimicrobial resistance. *Emerging Infectious Diseases*, v. 9, n. 5, p. 552-555, 2003.

VILCHES, S.; URGELL, C.; MERINO, S.; CHACÓN, M.R.; SOLER, L.; CASTRO-ESCARPULLI, G.; FIGUERAS, M.J. e TOMA, J.M. Complete Type III Secretion System of a Mesophilic *Aeromonas hydrophila* Strain. *Applied and Environmental Microbiology*, v.70, n.11, p. 6914-6919, 2004.

VIZZOTTO, B.V. Caracterização fenotípica e molecular de estirpes de *Aeromonas* isoladas no Paraná no período de 1999-2009. 101 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná – Curitiba, 2009.

VON GRAEVENITZ, A. The role of *Aeromonas* in diarrhea: a review. *Infection*, v. 35, n.2, p. 59-64, 2007.

WAUTERS, G. e VANECHOUTE, M. Approaches to the identification of aerobic gram-negative bacteria. In: VERSALOVIC, J.; CARROL, K.C.; FUNKE, G.; JORGENSEN, J.H.; LANDRY, M.L.; WARNOCK, D.W. *Manual of Clinical Microbiology* 10th ed., ASM Press, Washington, DC. p.539-559, 2011.

WOLF, S. Características de virulência em estirpes de *Aeromonas* spp. 101 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná – Curitiba, 2012.

YÁÑEZ, M.A.; CATALÁN, V.; APRÁIZ, D.; FIGUERAS, M.J.; MARTÍNEZ-MURCIA, A.J. Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.53, p. 875-883, 2003.

ZHU, D., LI, A., WANG, J., LI, M., CAI, T., HU, J. Correlation between the distribution pattern of virulence genes and virulence of *Aeromonas hydrophila* strains. *Frontiers of Biology in China*, v. 2, n. 2, p. 176–179, 2007.